

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202293175** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.01.17**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.05.07**

(51) Int. Cl. *C07K 14/71* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01)  
*A61P 27/06* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) **ЛОВУШКИ И МИНИ-ЛОВУШКИ VEGF, А ТАКЖЕ СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ  
ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И РАКА**

---

(31) **63/022,178**

(32) **2020.05.08**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/031271**

(87) **WO 2021/226444 2021.11.11**

(88) **2022.03.03**

(71) Заявитель:

**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Олсон Уильям, Мартин Джоэл, Стахл  
Нил, Ким Джи (US)**

(74) Представитель:

**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,  
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,  
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин  
Ш.Ф. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к ловушкам VEGF и мини-ловушкам VEGF, которые включают Ig-подобные домены рецептора VEGF, слитые с мультимеризующим компонентом, которые связываются с VEGF и блокируют его взаимодействие с рецептором VEGF. Такие молекулы применимы для лечения ангиогенных заболеваний глаз (например, возрастной дегенерации желтого пятна), рака и других нежелательных явлений ангиогенеза.

---

**A1**

**202293175**

**202293175**

**A1**

## **ЛОВУШКИ И МИНИ-ЛОВУШКИ VEGF, А ТАКЖЕ СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И РАКА**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Согласно настоящей патентной заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 63/022178, поданной 8 мая 2020 г., описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

### **Перечень последовательностей**

Перечень последовательностей по настоящей заявке подан в электронной форме в виде перечня последовательностей в формате ASCII с именем файла «250298\_000215\_SL.txt», датой создания 6 мая 2021 г. и размером 171982 байта. Представленный перечень последовательностей является частью описания и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Область настоящего изобретения относится к молекулам-ловушкам и мини-ловушкам VEGF, которые являются полезными для лечения рака и ангиогенных заболеваний глаз, а также к самим таким способам лечения.

### **ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Несколько заболеваний глаз связаны с патологическим ангиогенезом. Например, развитие возрастной макулярной дегенерации (AMD) связано с процессом, называемым хориоидальной неоваскуляризацией (CNV). Утечка из CNV вызывает отек желтого пятна и скопление жидкости под макулой, что приводит к потере зрения. Диабетический макулярный отек (DME) — еще одно глазное заболевание с ангиогенным компонентом. DME является наиболее распространенной причиной умеренной потери зрения у пациентов с диабетом и частым осложнением диабетической ретинопатии, заболевания, поражающего кровеносные сосуды сетчатки. Клинически значимый DME возникает, когда жидкость просачивается в центр макулы, светочувствительной части сетчатки, отвечающей за четкое прямое зрение. Жидкость в макуле может вызвать серьезную потерю зрения или слепоту. Еще одним заболеванием глаз, связанным с аномальным ангиогенезом, является окклюзия центральной вены

сетчатки (CRVO). CRVO вызывается закупоркой центральной вены сетчатки, что приводит к застою крови и жидкости в сетчатке. Сетчатка также может стать ишемической, что приведет к росту новых, несоответствующих кровеносных сосудов, которые могут вызвать дальнейшую потерю зрения и более серьезные осложнения. Высвобождение фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) способствует повышению проницаемости сосудов глаза и неадекватному росту новых сосудов. Таким образом, ингибирование свойств VEGF, способствующих ангиогенезу, является эффективной стратегией лечения ангиогенных заболеваний глаз.

Различные ингибиторы VEGF, такие как ловушка VEGF, Eylea (афлиберцепт), были одобрены для лечения таких заболеваний глаз. Фрагменты ловушек VEGF, мини-ловушки, также являются полезными средствами лечения таких ангиогенных заболеваний глаз. Однако мини-ловушки VEGF могут иметь недостаток, связанный с реакционной способностью по отношению к анти-шарнирным антителам (АНА) в организме пациента. Такие АНА распознают неоэпитоп, созданный, когда С-концевые остатки Fc иммуноглобулина, который был усечен, становятся открытыми. Хотя АНА были идентифицированы у людей с аутоиммунными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, функция таких антител изучена недостаточно. Falkenburg *et al.*, J. Immunol. 198: 82-93 (2017).

### Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает мини-ловушку VEGF, характеризующуюся доменной структурой:

$[(\text{VEGFR1 Ig2})-(\text{VEGFR2 Ig3})]_a$ -мультимеризующий компонент (MC),

или

$[(\text{VEGFR1 Ig2})-(\text{VEGFR2 Ig3})-(\text{VEGFR2 Ig4})]_a$ -мультимеризующий компонент (MC),

где  $a=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  или  $10$ ; и

где MC представляет собой шарнирную область, которая представляет собой:

- шарнирную область IgG1, содержащую стелс мутацию (от английского stealth - невидимый, скрытый) (*например*, где остатки ELLG (SEQ ID NO: 90) мутированы в PVA);
- химеру шарнирная область IgG1-шарнирная область IgG2 (*например*, где остатки IgG1 ELLG (SEQ ID NO: 90) мутированы в PVA);
- шарнирную область IgG1, содержащую мутацию убер (uber) (*например*, где остатки ELLG (SEQ ID NO: 90) мутированы в GGG);

- шарнирную область IgG1 с мутированными остатками APEL (SEQ ID NO: 91) (*например*, мутированными на GGGF (SEQ ID NO: 92), GGGG (SEQ ID NO: 93) или GGGL (SEQ ID NO: 94));
- шарнир IgG1 с делецией остатка APE;
- шарнирную область IgG2 (*например*, с двумя или четырьмя цистеинами, которые могут образовывать дисульфидные мостики);
- шарнирную область IgG3;
- шарнирную область IgG4;
- шарнирную область IgG4, содержащую стелс мутацию (*например*, где остатки шарнира IgG4 EFLG (SEQ ID NO: 95) мутированы в PVA); или
- шарнирную область IgG4, содержащую мутацию убер (*например*, где остатки EFLG (SEQ ID NO: 95) мутированы в GGG),

*например*, где шарнирная область содержит, состоит или состоит в основном из аминокислотной последовательности:

DKTHTCPRPCRAPVA (SEQ ID NO: 2) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1 стелс Fc);

DKTHTCPRPCRAPGGG (SEQ ID NO: 3) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1 убер Fc);

ERKCCVESPCCRAPVA (SEQ ID NO: 4) (см. мини-ловушку VEGF hIgG2 Fc с 4 Cys);

VESPCCRAPVA (SEQ ID NO: 5) (см. мини-ловушку VEGF hIgG2 Fc с 2 Cys);

ERKSCDTPPPPCRAPELLG (SEQ ID NO: 6 или ее аминокислоты 6-21) (см. мини-ловушку VEGF hIgG3 Fc);

ESKYGPPPCRAPEFLG (SEQ ID NO: 7 или ее аминокислоты 4-18) (см. мини-ловушки VEGF hIgG4 Fc);

ESKYGPPPCRAPVA (SEQ ID NO: 8 или ее аминокислоты 4-17) (см. мини-ловушку VEGF hIgG4 стелс Fc);

ESKYGPPPCRAPGGG (SEQ ID NO: 9 или ее аминокислоты 4-17) (см. мини-ловушку VEGF hIgG4 убер Fc);

DKTHTCPRPCRAPVA (SEQ ID NO: 10) (см. мини-ловушку VEGF химера hIgG1-2 Fc);

DKTHTCPRPCPGGFLG (SEQ ID NO: 11) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1 мут GGGF (SEQ ID NO: 92) Fc);

DKTHTCPRPCPGGGLG (SEQ ID NO: 12) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1 мут GGGG (SEQ ID NO: 93) Fc);

DKTHTCPRPCPGGLLG (SEQ ID NO: 13) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1 мут GGGL (SEQ ID NO: 94) Fc);

DKTHTCPRCP<sup>LLG</sup> (SEQ ID NO: 14) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1 Del (APE) Fc); или  
 DKTHTCPRCP<sup>APPELLG</sup> (SEQ ID NO: 68); или  
 любую из SEQ ID No: 15-22 или 74-77 до, но не включая, GPSV (SEQ ID NO: 96) сайта  
 расщепления IdeS, как показано на фигуре 2.

Настоящее изобретение также обеспечивает ловушку VEGF, характеризующуюся доменной структурой:

[(VEGFR1 Ig2)-(VEGFR2 Ig3)]<sub>a</sub>-мультимеризующий компонент (MC),

или

[(VEGFR1 Ig2)-(VEGFR2 Ig3)-(VEGFR2 Ig4)]<sub>a</sub>-мультимеризующий компонент (MC),

где a=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

где MC включает шарнирную область и сайт расщепления протеазой, который представляет собой:

- шарнирную область IgG1, содержащую стелс мутацию;
- химеру шарнирная область IgG1-шарнирная область IgG2;
- шарнирную область IgG1 с мутированными остатками APEL (SEQ ID NO: 91) (*например*, на GGGF (SEQ ID NO: 92), GGGG (SEQ ID NO: 93) или GGGL (SEQ ID NO: 94));
- шарнирную область IgG1 с удаленными остатками APE;
- шарнирную область IgG2 (*например*, включающую два или четыре остатка цистеина, которые могут образовывать дисульфидные мостики);
- шарнирную область IgG3;
- шарнирную область IgG4; или
- шарнирную область IgG4, содержащую стелс мутацию;

*например*, где MC включает аминокислотную последовательность:  
 EРKSCDKTHTCPRCP<sup>APPVAGPSVFLFRRPKPKDT</sup> (SEQ ID NO: 16 или ее вариант) или ее аминокислоты 6-24 (см. ловушку VEGF hIgG1 стелс Fc);

EРKSCDKTHTCPRCP<sup>APGGGPSVFLFRRPKPKDT</sup> (SEQ ID NO: 17 или ее вариант) или ее аминокислоты 6-24 (см. ловушку VEGF hIgG1 убер Fc);

EРKCCVЕСRCP<sup>APPVAGPSVFLFRRPKPKDT</sup> (SEQ ID NO: 18 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-21 или 6-21 (VECP<sup>APPVAGPSV</sup> (SEQ ID NO: 97)) (см. ловушку VEGF hIgG2 Fc с 2Cys или с 4Cys);

EPKSCDTPPPCPPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 19 или ее вариант) или ее аминокислоты 6-25 (см. ловушку VEGF hIgG3 Fc);

ESKYGPPPCPPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 20 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-22 (см. ловушку VEGF hIgG4 Fc);

ESKYGPPPCPPPCPAAPPVAGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 21 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-21 (см. ловушку VEGF hIgG4 стелс Fc);

ESKYGPPPCPPPCPAAPGGGGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 22 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-21 (см. ловушку VEGF hIgG4 убер Fc);

DKTHTCPRPCAPPVAGPSV (SEQ ID NO: 70) (см. ловушку VEGF hIgG1 стелс Fc или химера hIgG1-2 Fc);

DKTHTCPRPCGGGFLGGPSV (аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 74) (см. ловушку VEGF hIgG1 мут GGGF (SEQ ID NO: 92) Fc);

DKTHTCPRPCGGGGLGGPSV (аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 75) (см. ловушку VEGF hIgG1 мут GGGG (SEQ ID NO: 93) Fc);

DKTHTCPRPCGGGLLGGPSV (аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 76) (см. ловушку VEGF hIgG1 мут GGGL (SEQ ID NO: 94) Fc); или

DKTHTCPRPCLLGGPSV (аминокислоты 6-22 из SEQ ID NO: 77) (см. ловушку VEGF hIgG1 Del (APE) Fc).

В одном варианте осуществления изобретения любая из ловушек или мини-ловушек VEGF, представленных в настоящем документе, характеризуется одним или несколькими из следующих признаков:

- связывается с человеческим VEGF<sub>165</sub> с  $K_D$  около 1-2 пМ или более высокой аффинностью при 25°C, где указанная аффинность измерена с помощью поверхностного плазмонного резонанса;
- имеет молекулярную массу гомодимера менее 97 кДа (*например*, около 50 кДа, 49 кДа, 48 кДа, 47 кДа или 46 кДа; или меньше любой из указанных выше масс);
- имеет  $IC_{50}$  около  $1-2 \times 10^{-11}$  М для блокирования VEGF<sub>121</sub> и/или VEGF<sub>165</sub> активации VEGFR1 и/или VEGFR2, как измерено в клетках HEK293, экспрессирующих внеклеточный домен рецептора VEGF, слитый с внутриклеточным доменом IL18R альфа или IL18R бета и имеющих репортерный ген NFκарраВ-люцифераза-IRES-eGFP;

- проявляет меньшую иммуногенность в образцах сыворотки обезьян, ранее не подвергавшихся лечению, и/или в образцах исходной сыворотки человека с AMD/DME по сравнению с REGN7483

(SDTGRPFVEMYSEIPEIINHMTGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI  
GLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKK  
LVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPELLG

(SEQ ID NO: 67)), как измерено с помощью анализа антител против лекарственного средства (ADA);

- образует комплекс 1:1 с гомодимером VEGF<sub>165</sub>;
- образует комплекс 1:1:2 с гомодимером VEGF<sub>165</sub> и фрагментом Fab против VEGF (мини-ловушка VEGF:гомомер VEGF<sub>165</sub>: фрагмент Fab);
- уменьшает неоваскуляризацию сетчатки при интравитреальном введении в мышинной модели ретинопатии, индуцированной кислородом (OIR);
- демонстрирует более коротким интравитреальный период полураспада, чем афлиберцепт, в глазах кролика при интравитреальной инъекции;
- демонстрирует более низкие уровни свободной молекулы в плазме при интравитреальной инъекции в дозе 5,5 мг/глаз, чем при интравитреальной инъекции афлиберцепта в дозе 4 мг/глаз у примата, отличного от человека;
- демонстрирует концентрацию около 0,1 или 0,2, или 0,1-0,2 мкг/мл (или меньше) свободной молекулы в плазме примата, отличного от человека, через 336 часов после интравитреальной инъекции около 5,5 мг/глаз;
- значительно не накапливается в глазу примата, отличного от человека, после четырех интравитреальных инъекций примерно каждые 28 дней около 5,5 мг/глаз;
- в композиции, содержащей ловушки VEGF и/или мини-ловушку VEGF, такие молекулы гликозилированы одним или несколькими остатками фукозы (*например*, около 43-45%), остатками галактозы (*например*, около 64-72%), остатками сиаловой кислоты (*например*, около 20-27%), остатками с высоким содержанием маннозы (*например*, Man5) (*например*, около 19-25%) и/или бисектными гликанами (*например*, около 1,6-1,9%; *т.е.* N-гликан, имеющий N-ацетилглюкозамин между двумя регулярными ветвями, см., *например*, фигуру 26(A));
- один или несколько гистидинов окислены до 2-оксо-гистидина;
- один или несколько триптофанов раскислены;

- один или несколько их аспарагинов гликозилированы;
- один или несколько серинов или треонинов O-гликозилированы;
- один или несколько аспарагинов дезамидированы;
- один или несколько мотивов аспартат-глицин превращаются в изо-аспартат-глицин и/или Asn-Gly;
- один или несколько метионинов окислены;
- один или несколько триптофанов превращаются в N-формилкинуренин;
- один или несколько аргининов превращаются в Arg 3-дезоксиглюкозон;
- C-концевой остаток отсутствует;
- имеется один или несколько негликозилированных сайтов гликозилирования;
- является ксилозилированной;
- гликируется по лизину;
- содержит цистин со свободной тиольной группой;
- содержит внутрицепочный дисульфидный мостик;
- содержит дисульфидные мостики в параллельной или перекрестной ориентации; и/или
- содержит лизин или аргинин, который является карбоксиметилированным.

В одном варианте осуществления изобретения МС любой из ловушек VEGF содержит аминокислотную последовательность:

GPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
 23);

GPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPVLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
 24);

GPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
 25);

GPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 26);

GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

PENNYKTTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27);

GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 28);

GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 29);

GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 30);

GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 31);

VECPAPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 78);

DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

K (SEQ ID NO: 79);

ERKCCVECPAPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV  
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL

PGK (SEQ ID NO: 80);

ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV

KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS  
LGK (SEQ ID NO: 81);

DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKPDLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF  
NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
K (SEQ ID NO: 82);

DKTHTCPPCPGGGFLGGPSVFLFPPPKPDLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK (SEQ ID NO: 83);

DKTHTCPPCPGGGFLGGPSVFLFPPPKPDLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK (SEQ ID NO: 84);

DKTHTCPPCPGGGFLGGPSVFLFPPPKPDLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK (SEQ ID NO: 85); или

DKTHTCPPCPLLGGPSVFLFPPPKPDLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 86).

**В одном варианте осуществления изобретения мини-ловушка VEGF содержит  
аминокислотную последовательность:**

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKERKCCVECPAPPVA  
(SEQ ID NO: 32);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKVECPAPPVA (SEQ ID  
NO: 33);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPVA  
(SEQ ID NO: 34);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL

VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKESKYGPPCPPAPPVA

(SEQ ID NO: 35);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPAPPVA

(SEQ ID NO: 36);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCGGFLG

(SEQ ID NO: 37);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCGGGFLG

(SEQ ID NO:38);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCGGGLLG

(SEQ ID NO: 39);

или

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPLLG

(SEQ ID NO: 40).

**В варианте осуществления изобретения ловушка VEGF содержит аминокислотную последовательность:**

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKVECPAPPVAGPSVFLFP  
PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY  
KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPAPPVAGPSVF  
LFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL

VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKERKCCVECPPCPAPPVAGPS  
VFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWL  
NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 43);  
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKESKYGPPCPPPAPPVAGPS  
VFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 44);  
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPVAGPSVF  
LFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNG  
KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 45);  
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPGGGFLGGPSV  
FLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 46);  
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPGGGFLGGPSV  
FLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47);  
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPGGGFLGGPSV  
FLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 48); or  
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPGGGFLGGPSVFLF  
PPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

YKCKVSNKALPARIKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 49).

В одном варианте осуществления изобретения ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF является гликозилированной, *например*, где указанная ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF содержит N-связанные гликаны; указанная ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF содержит O-связанные гликаны; указанная ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF является сиалилированной, галактозилированной и/или фукозилированной по одному или нескольким остаткам; указанная ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF содержит N-связанные гликаны с 5 остатками маннозы (Man5) по одному или нескольким остаткам; и/или указанная ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF содержит гликозилирование клеток CHO. Объем настоящего изобретения включает композицию, содержащую гетерогенную смесь гликозилированных вариантов ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, представленных в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления изобретения примерно 47% ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF сиалилированы, примерно 70% ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF галактозилированы, примерно 36% ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF фукозилированы и/или около 11% ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF гликозилированы по Man-5.

Настоящее изобретение также включает комплекс, содержащий гомодимер ловушки или мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; и/или mREGN10515) и VEGF; *например*, где VEGF представляет собой человеческий VEGF, такой как человеческий VEGF<sub>165</sub> или VEGF<sub>121</sub>; и/или комплекс включает антитело против VEGF или его фрагмент Fab, *например*, который включает человеческий VEGF и фрагмент Fab против VEGF, где стехиометрическое соотношение составляет 1:1:2 (мини-ловушка VEGF: человеческий VEGF: Fab); и/или где комплекс представляет собой комплекс между мини-ловушкой VEGF и VEGF, и стехиометрическое соотношение мини-ловушки VEGF к VEGF составляет 1:1.

Настоящее изобретение обеспечивает фармацевтический состав (*например*, водный фармацевтический состав), содержащий ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF по настоящему изобретению (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187;

REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; и/или mREGN10515) и фармацевтически эффективный носитель.

Настоящее изобретение также обеспечивает выделенный полинуклеотид, который кодирует ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF по настоящему изобретению (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; и/или mREGN10515), например, SEQ ID NO: 71, 72 или 73; а также векторы, которые включают полинуклеотид.

Настоящее изобретение также обеспечивает клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид или вектор по настоящему изобретению (*например*, клетку яичника китайского хомячка).

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает выделенный полипептид, содержащий, состоящий или состоящий в основном из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 32-49.

Настоящее изобретение также обеспечивает сосуд или инъекционное устройство (*например*, шприц, одноразовый шприц или предварительно наполненный шприц), например, стерильное, содержащее ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; и/или mREGN10515) или их фармацевтический состав по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; и/или mREGN10515) или их фармацевтического состава, включающий контактирование ловушки VEGF по настоящему изобретению с протеазой (*например*, IdeS, *например*, содержащей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 50-65), которая расщепляет MC указанной ловушки VEGF, и инкубацию ловушки VEGF и протеазы в условиях, способствующих расщеплению, и, необязательно, объединение мини-ловушки VEGF, являющейся продуктом расщепления, с фармацевтически эффективным носителем.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF (например, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; и/или mREGN10515), или их фармацевтического состава, включающий инкубацию клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF, или их вектор, в культуральной среде в условиях, которые способствуют экспрессии ловушки или мини-ловушки, и необязательно выделение ловушки или мини-ловушки из клетки-хозяина и/или среды, и необязательно объединение ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, являющейся продуктом расщепления, с фармацевтически эффективным носителем. Необязательно способ включает стадию контактирования ловушки VEGF с протеазой, которая расщепляет MC указанной ловушки VEGF, и инкубацию ловушки VEGF и протеазы в условиях, способствующих расщеплению. Ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF, которая является продуктом такого способа, также является частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения или предупреждения ангиогенного заболевания глаз (*например*, возрастной дегенерации желтого пятна, влажной возрастной дегенерации желтого пятна, сухой возрастной дегенерации желтого пятна, отека желтого пятна, отека желтого пятна после окклюзии вены сетчатки, окклюзии вен сетчатки (RVO), окклюзии центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзии ветвей вен сетчатки (BRVO), ретинопатии недоношенных (ROP), диабетического макулярного отека (DME), хориоидальной неоваскуляризации (CNV), неоваскуляризации радужки, неоваскулярной глаукомы, послеоперационного фиброза при глаукоме, пролиферативной витреоретинопатии (PVR), неоваскуляризации диска зрительного нерва, неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации сетчатки, витреальной неоваскуляризации, паннуса, птеригиума, сосудистой ретинопатии, диабетической ретинопатии у субъекта с диабетическим макулярным отеком; диабетической ретинопатии, непролиферативной диабетической ретинопатии и/или пролиферативной диабетической ретинопатии) у субъекта (*например*, у человека), включающий введение (*например*, внутриглазным способом или интравитреально) терапевтически эффективного количества ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF по настоящему изобретению (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511;

mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; и/или mREGN10515) субъекту. В одном варианте осуществления изобретения неоваскуляризация сетчатки уменьшается в глазу субъекта и/или проницаемость сосудов сетчатки снижается в глазу субъекта.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения или предупреждения рака (*например*, рака легких, рака молочной железы, колоректального рака, метастатического колоректального рака, рака предстательной железы, рака кожи или рака желудка) у субъекта (*например*, у человека), включающий введение (*например*, внутривенно) терапевтически эффективного количества ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; и/или mREGN10515).

Настоящее изобретение также обеспечивает способ введения ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; и/или mREGN10515) или их фармацевтического состава по настоящему изобретению субъекту (*например*, человеку), включающий введение (*например*, путем инъекции, *например*, интравитреальной инъекции) ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, или фармацевтического состава в организм субъекта.

Настоящее изобретение также включает способ уменьшения неоваскуляризации сетчатки и/или сосудистой проницаемости сетчатки у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; и/или mREGN10515; и/или фармацевтического состава, как указано в настоящем документе).

Настоящее изобретение охватывает любые ловушки или мини-ловушки VEGF, состоящие из аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе, за исключением дополнительного включения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (*например*, до 10) дополнительных аминокислот, *например*, на N-конце или C-конце; а также любой из связанных способов их применения.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

**Фигура 1.** Краткое описание ловушек и мини-ловушек VEGF с аминокислотами шарнира IgG, показанными [//= сайт расщепления IdeS]. Мини-ловушка VEGF, образованная в результате расщепления IdeS, относится к мини-ловушке, полученной в результате расщепления IdeS указанной ловушки VEGF. IgG включает информацию, касающуюся формы IgG в мультимеризующем компоненте ловушки или мини-ловушки.

**Фигура 2.** Последовательности шарнирной области ловушки VEGF с указанными сайтами расщепления IdeS. Расположения остатков в шарнирной области Fc IgG1 (PEL и T), которые могут быть реакционноспособными по отношению к уже существующим анти-шарнирным антителам в сыворотке пациента, указаны стрелками. Остатки нижней, центральной и верхней шарнирной области отмечены прямоугольником. (SEQ ID No: 15-22, 16, 74-77, соответственно)

**Фигура 3.** Краткое описание ловушек и мини-ловушек VEGF с общепринятыми и описательными названиями и указанными молекулярными массами.

**Фигура 4.** Схематическое представление образования типичной мини-ловушки VEGF в результате расщепления IdeS ловушки VEGF.

**Фигура 5.** Сравнение последовательностей между афлиберцептом (REGN3), мини-ловушкой VEGF, полученной из REGN3 (REGN7483<sup>F</sup>), ловушкой VEGF hIgG1стелс Fc, ловушкой VEGF hIgG2 Fc с 4 cys, мини-ловушкой VEGF hIgG2 с 4 cys, ловушкой VEGF hIgG2 Fc с 2 cys и мини-ловушкой VEGF hIgG2 с 2 cys.

**Фигура 6.** Сравнение последовательности между афлиберцептом (REGN3), мини-ловушкой VEGF, полученной из REGN3 (REGN7483<sup>F</sup>), REGN10513, REGN10514, REGN10512, REGN10515, REGN10104, REGN10511, REGN10102, REGN10117 и REGN10187. Фигура раскрывает «GGGF», «GGGG» и «GGGL» как SEQ ID NO: 92-94, соответственно.

**Фигуры 7 (A-J).** Аминокислотные последовательности ловушек VEGF и мини-ловушек VEGF (A) REGN3, REGN7483, (B) REGN10104, mREGN10104, (C) REGN10102, REGN10105, (D) REGN1017, REGN10103, (E) REGN10187, mREGN10187, (F) REGN10511, mREGN10511, (G) REGN10512, mREGN10512, (H)REGN10513, mREGN10513, (I) REGN10514, REGN11095 и (J) REGN10515, mREGN10515. Сайты расщепления протеазой IdeS в ловушках VEGF указаны стрелкой. N-концевой домен 2 VEGFR1 затенен темным цветом, а домен 3 VEGFR2 затенен светлым цветом и

заклучен в рамку. С-концевой домен Fc в ловушках VEGF затенен темным цветом. Шарнирные области ловушек VEGF и мини-ловушек VEGF не заштрихованы. Фигура раскрывает «GGGF», «GGGG» и «GGGL» как SEQ ID NO: 92-94, соответственно.

**Фигуры 8 (А-Е).** Биологический анализ активности ловушек VEGF и мини-ловушек VEGF (REGN10117 (А), REGN10104 и mREGN10104 (В), REGN10102 (С), REGN10187 и mREGN10187 (D); а также REGN10103 и REGN10105 (Е); наряду с контролями REGN7483, REGN3 (VEGFT) и VEGF<sub>121</sub> в каждом), блокирующих активацию VEGF<sub>121</sub> (VEGF<sub>121</sub> при 40 пМ) VEGFR1 экспрессирующих клеток (293/D9/VEGFR1).

**Фигуры 9 (А-Е).** Биологический анализ активностb ловушек VEGF и мини-ловушек VEGF (REGN10102 (А), REGN10104 и mREGN10104 (В) REGN10117(С), REGN10187 (D) REGN10187 и mREGN10187 (D); и REGN10103 и REGN101005 (Е); наряду с контролями REGN7483, REGN3 (VEGFT) и VEGF<sub>121</sub> в каждом), блокирующих активацию VEGF<sub>121</sub> (VEGF<sub>121</sub> при 60 пМ) VEGFR2 экспрессирующих клеток (293/D9/VEGFR2).

**Фигуры 10 (А-F).** Анализ SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях опосредованного протеазой IdeS расщепления различных ловушек VEGF (REGN3 (А), REGN10102 (В), REGN10511 (С), REGN10512 (D), REGN10514 (Е) и REGN10515 (F)) во времени (после инкубации в течение 0, 1, 2 или 4 часов, или в течение ночи (O/N)). Фигура раскрывает «GGGF» и «GGGL» как SEQ ID NO: 92 и 94, соответственно.

**Фигуры 11 (А-В).** Электрохемилюминесцентный иммуноанализ (ECL) на антитела к лекарственным средствам – мостиковый формат. (А) Схема формата анализа. (В) Анализ REGN7483<sup>F</sup>, REGN10105 (из расщепленной IdeS ловушки VEGF с IgG2 Fc с 2 Cys), mREGN10104 (расщепленной IdeS из REGN10104), REGN10105 (рекомбинантно экспрессированной в клетках CHO), REGN10103 (из расщепленной IdeS ловушки VEGF с IgG2 Fc с 4 Cys) и mREGN10187 для ответов на уже существующие анти-шарнирные антитела (АНА) в образцах сыворотки обезьян, ранее подвергавшихся лечению.

**Фигура 12.** Электрохемилюминесцентный иммуноанализ (ECL) на антитела к лекарственным средствам – мостиковый формат. Анализ REGN7483<sup>F</sup>, REGN10105 (из расщепленной IdeS ловушки VEGF с IgG2 Fc с 2 Cys), mREGN10104 (из расщепленной IdeS REGN10104), REGN10105 (рекомбинантно экспрессированной в клетках CHO), REGN10103 (расщепленной IdeS из ловушки VEGF с IgG2 Fc с 4 Cys) и mREGN10187

для ответов на уже существующие анти-шарнирные антитела (АНА) в образцах сыворотки человека с AMD/DME.

**Фигура 13.** Схематическая диаграмма стелс IgG4 человека и стелс IgG1 человека для снижения эффекторных функций. Фигура раскрывает «CPPC» и «EFLG» как SEQ ID NO: 100 и 95, соответственно.

**Фигура 14.** Схематическая диаграмма антитела IgG4, обладающего стелс мутациями (SEQ ID NO: 111 и 109, соответственно, в порядке появления).

**Фигура 15.** Последовательность IgG4 с последовательностью нижней шарнирной области IgG2. Последовательность конструкции заключена в рамку. Гибридные ловушки VEGF IgG4/2, содержащие MC с заключенной в рамку шарнирной последовательностью IgG2, как показано на фигуре (или начиная с мотива IgG4 ESKY (SEQ ID NO: 98)), и их мини-ловушки (расщепленные перед GPSV (SEQ ID NO: 96)) являются частью настоящего изобретения. Фигура раскрывает SEQ ID NO: 112-114, соответственно, в порядке появления.

**Фигура 16.** Схематическая диаграмма антитела IgG1, обладающего стелс мутациями (SEQ ID NO: 102 и 109, соответственно, в порядке появления).

**Фигура 17.** Последовательность IgG1 с безэфекторной последовательностью CH2. Гибридные ловушки VEGF IgG1/2, содержащие MC с заключенной в рамку шарнирной последовательностью IgG2, как показано на фигуре (или начиная с мотива IgG1 DKTHT (SEQ ID NO: 99)), и их мини-ловушки (расщепленные перед GPSV (SEQ ID NO: 96)) являются частью настоящего изобретения. Фигура раскрывает SEQ ID NO: 112-114, соответственно, в порядке появления.

**Фигуры 18 (А-В).** Анализ комплексов (А) REGN10105: hVEGF<sub>165</sub> и (В) REGN11095: hVEGF<sub>165</sub> (сплошные линии) с помощью эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым рассеянием лазерного света (SEC-MALS). Хроматограммы отдельных образцов REGN10105 или REGN11095 (серая пунктирная линия) и hVEGF<sub>165</sub> (черная пунктирная линия) также накладываются друг на друга. Для каждого образца показан относительный показатель преломления в зависимости от объема удерживания и указаны измеренные молярные массы разрешенных пиков.

**Фигуры 19 (А-В).** Анализ методом криоэлектронной томографии (Cryo-EM) структуры мини-ловушки VEGF REGN10105 в комплексе с VEGF и REGN18 Fab. Анализировали образцы только hVEGF, только REGN10105, REGN10105 с hVEGF или REGN10105, hVEGF и REGN18 Fab. (А) Хроматограмма SEC-MALS смеси REGN10105/VEGF/REGN18 Fab. (В) Необработанное изображение Cryo-EM,

комплексы/частицы обведены кружком. (C) Выбор средних значений класса 2D; стрелки указывают домен 3 VEGFR2. (D) Отдельные классы 2D; стрелка указывает на VEGF или домен 3 VEGFR2.

**Фигуры 20 (А-В).** Обобщенные данные по (А) аваскулярным и (В) аномальным областям, наблюдаемым в сетчатках от мышинных моделей индуцированной кислородом ретинопатии, интравитреально получавших Fc человека, афлиберцепт, REGN11095 или REGN10105. Анализировали плоские препараты сетчатки, окрашенные GS Lectin I (для исследования аваскулярной области) или NG2 (для исследования аномальной области).

**Фигура 21.** Обобщенные данные по нормализованным (по отношению к обработанным hFc) аномальным областям, наблюдаемым в сетчатках от мышинных моделей индуцированной кислородом ретинопатии, не инъецированных или получавших интравитреально человеческий Fc, афлиберцепт (0,05, 0,5 или 5 мкг) или REGN10105 (0,025, 0,25 или 2,5 мкг). Были проанализированы плоские препараты сетчатки, окрашенные или NG2. Данные нормализовали по отношению к группе, получавшей Fc.

**Фигуры 22 (А-В).** Обобщенные данные по (А) аваскулярным и (В) аномальным областям (нормализованным по отношению к обработанным hFc), наблюдаемым в сетчатках от мышинных моделей индуцированной кислородом ретинопатии, которым системно вводили человеческий Fc, афлиберцепт, REGN11095 или REGN10105. Анализировали плоские препараты сетчатки, окрашенные GS Lectin I (для исследования аваскулярной области) или NG2 (для исследования аномальной области).

**Фигуры 23 (А-Ф).** Анализ распада ловушек VEGF в стекловидном теле новозеландских белых кроликов. (А) REGN3 (животные 428, 429 и 430), (В) REGN7483 (животные 434, 435 и 436), (С) REGN3 (животные 570, 571 и 572), (D) REGN10105 (животные 573, 574 и 575) и (Е) REGN11095 (животные 576, 577 и 578). OS = левый глаз, OD = правый глаз. (F) внутриглазное давление (IOP) (мм. рт. ст.) до и после внутривенной инъекции REGN3, REGN10105 или REGN11095.

**Фигуры 24 (А-Д).** Анализы свободных и связанных мини-ловушек VEGF в глазах самцов и самок приматов, отличных от человека, во времени, которым несколько раз (в дни 1, 29, 57 и 85) вводили REGN10105 или REGN11095. (А) свободная REGN10105, (В) свободная REGN11095, (С) связанная REGN10105, (D) связанная REGN11095.

**Фигура 25.** Системные (в плазме) концентрации ловушек и мини-ловушек VEGF во времени у приматов, отличных от человека, которым интравитреально дозировали REGN7483 (5,5 мг/глаз), REGN10105 (5,5 мг/глаз) или афлиберцепт (4 мг/глаз).

**Фигуры 26 (А-В).** HILIC-FLR Хроматограмма N-связанных гликанов из REGN10103 и REGN10105 (А) перекрывающиеся и (В) отдельные. REGN10103 или REGN10105 с любым одним или несколькими из указанных N-гликанов, или композиции, имеющие профиль гликанов, представленный на фигуре, являются частью настоящего изобретения.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение обеспечивает ловушки VEGF и мини-ловушки VEGF, которые по сравнению с другими мини-ловушками демонстрируют превосходную стабильность и низкую вязкость, особенно при высоких концентрациях. Такие характеристики делают ловушки и мини-ловушки VEGF подходящими для составления при высокой концентрации, что, в свою очередь, обеспечивает введение высоких доз в небольшом объеме и, соответственно, менее частое дозирование. Анатомия и физиология глаза делают нежелательным интравитреальное введение больших объемов; таким образом, интравитреальные инъекции следует делать в объеме не более чем около 100 мкл. Это сочетание факторов делает разработку белковых лекарственных средств, применимых для интравитреальной инъекции достаточного количества в подходящем объеме, технически сложной задачей. Еще более сложной задачей является максимальное увеличение количества доставляемого лекарственного средства, чтобы таким образом свести к минимуму количество доз, необходимых для заданного периода времени. Ловушки и мини-ловушки, обеспеченные в настоящем документе, преодолели эти технические препятствия.

Вязкость водных композиций, включающих описанные в настоящем документе мини-ловушки VEGF, такие как REGN10105, является низкой даже по сравнению с другими мини-ловушками VEGF. Низкая вязкость позволяет проводить интравитреальное введение с помощью игл более высокого калибра, что сводит к минимуму дискомфорт для пациента и повышает его приверженность лечению.

Кроме того, мини-ловушки VEGF, указанные в настоящем документе, *например*, REGN10105 и REGN11095, проявляют более высокую стабильность (более низкое образование высокомолекулярных соединений), чем афлиберцепт в условиях

ускоренных испытаний. REGN10105 также отличается особой фотостабильностью по сравнению с другими мини-ловушками VEGF, такими как REGN7483.

Уровень потенциального системного воздействия после интравитреального введения описанной в настоящем документе мини-ловушки VEGF, *например*, REGN10105, также ниже, чем у афлиберцепта. В частности, период полураспада REGN10105 в стекловидном теле кролика короче, что снижает вероятность проникновения из глаза в остальную часть тела.

Мини-ловушки VEGF, представленные в настоящем документе, характеризующиеся *in vitro* как обладающие меньшей реакционной способностью по отношению к уже существующим анти-шарнирным антителам, имеют меньший потенциал для иммуногенных реакций при введении. Например, в мини-ловушке VEGF с шарнирной областью Fc на основе IgG2 отсутствуют остатки PEL и T в шарнирных областях Fc на основе IgG1 (например, в REGN7483), которые могут быть реакционноспособными по отношению к уже существующим анти-шарнирным антителам.

Ловушки VEGF представляют собой химерные молекулы на основе рецептора VEGF, которые включают два или более иммуноглобулин(Ig)-подобных домена рецептора VEGF, такого как VEGFR1 (также обозначаемый как Flt1) (*например*, домен Ig2 VEGFR1 (VEGFR1d2)) и/или VEGFR2 (также обозначаемый как Flk1 или KDR) (*например*, домен Ig3 VEGFR2 (VEGFR2d3)), предпочтительно расположенные как [(VEGFR1d2)-(VEGFR2d3)]<sub>n</sub> (*например*, где n=1) на каждой полипептидной цепи ловушки VEGF, а также содержат Fc-домен, облегчающий мультимеризацию (*например*, димеризацию) двух или более химерных полипептидов).

Мини-ловушка VEGF включает VEGF-связывающие домены (*например*, Ig-домен 2 VEGFR1 и Ig-домен 3 VEGFR2, расположенные аналогично ловушке VEGF, такой как афлиберцепт), связанные с фрагментом Fc-домена, предпочтительно, шарнирной областью Fc-домена (*например*, включая верхнюю часть шарнирной области (иногда начинающуюся с мотива E-(P, S или R)-K), центральную часть шарнирной области и нижнюю часть шарнирной области), простирающуюся до, но не включая, сайта расщепления GPSV (SEQ ID NO: 96) для протеазы IdeS (см., *например*, фигуру 2). Шарнирная область предпочтительно включает один или несколько (*например*, 2 или 4) цистеинов, которые могут образовывать цистеиновый мостик с другой полипептидной цепью мини-ловушки VEGF. Предпочтительно ловушки и мини-ловушки VEGF представляют собой гомодимерные комплексы таких

полипептидов. Ловушки и мини-ловушки VEGF также могут иметь состав, включающий гетерогенные популяции таких мономерных полипептидов и гомодимеров. Такие мономеры, мультимеры и композиции составляют часть настоящего изобретения. Полипептидные гомодимеры могут быть связаны друг с другом, например, дисульфидными мостиками. Схематические изображения ловушки VEGF и мини-ловушки VEGF представлены на фигуре 4.

Домен «Ig» VEGFR относится к указанному иммуноглобулиноподобному домену указанного рецептора VEGF.

Стандартные методы молекулярной биологии описаны в Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2<sup>nd</sup> Edition, 2001 3<sup>rd</sup> Edition) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, Calif.). Стандартные методы также описаны в Ausbel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y., где описывается клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжах (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белков (том 3) и биоинформатика (том 4).

Описаны общие методы очистки белка, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию (Coligan *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Описаны химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, получение слитых белков, гликозилирование белков (см., *например*, Coligan *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, N.Y., pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, Mo.; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Описаны продукция, очистка и фрагментация поликлональных и моноклональных антител (Coligan *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Harlow and Lane, *supra*). Доступны стандартные методики для характеристики взаимодействий лиганд/рецептор (см., *например*, Coligan *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Доступны методы проточной цитометрии, включая сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS) (см., *например*, Owens *et al.* (1994) Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J.; Givan (2001) Flow Cytometry, 2<sup>nd</sup> ed.; Wiley-Liss, Hoboken, N.J.; Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J.). Доступны флуоресцентные реагенты, подходящие для модификации нуклеиновых кислот, включая праймеры и зонды нуклеиновых кислот, полипептиды и антитела, для использования, *например*, в качестве диагностических реагентов (Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St. Louis, Mo.).

Описаны стандартные методы гистологии иммунной системы (см., *например*, Muller-Harmelink (ed.) (1986) Human Thymus: Histopathology and Pathology, Springer Verlag, New York, N.Y.; Hiatt *et al.* (2000) Color Atlas of Histology, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, Pa.; Louis *et al.* (2002) Basic Histology: Text and Atlas, McGraw-Hill, New York, N.Y.).

### **МИНИ-ЛОВУШКИ VEGF И ЛОВУШКИ VEGF**

Мини-ловушки VEGF по настоящему изобретению проявляют превосходную активность в отношении нейтрализации VEGF наряду с низкой иммуногенностью и вязкостью, а также высокой стабильностью. Кроме того, ловушки VEGF по настоящему изобретению хорошо подходят для создания таких мини-ловушек VEGF, поскольку они расщепляются протеазой, такой как протеаза IdeS (*например*, *Streptococcus pyogenes* IdeS).

Настоящее изобретение обеспечивает мини-ловушки VEGF, которые содержат следующую доменную структуру:

$[(\text{VEGFR1 Ig2})-(\text{VEGFR2 Ig3})]_a$ -мультимеризующий компонент (MC),

или

$[(\text{VEGFR1 Ig2})-(\text{VEGFR2 Ig3})-(\text{VEGFR2 Ig4})]_a$ -мультимеризующий компонент (MC),

где  $a=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  или  $10$ ; и

где MC представляет собой шарнирную область, которая представляет собой:

- шарнирную область IgG1, содержащую стелс мутацию (*например*, в которой остатки ELLG (SEQ ID NO: 90) мутированы в PVA);
- шарнирную область IgG1, содержащую мутацию убер (*например*, где остатки ELLG (SEQ ID NO: 90) мутированы в GGG);

- химеру шарнирная области IgG1-шарнирная область IgG2 (*например*, где остатки IgG1 ELLG (SEQ ID NO: 90) мутированы в PVA);
  - шарнирную область IgG1 с остатками APEL (SEQ ID NO: 91), которые мутированы (*например*, мутированы в GGGF (SEQ ID NO: 92), GGGG (SEQ ID NO: 93) или GGGL (SEQ ID NO: 94));
  - шарнирную область IgG1 с делецией остатка APE;
  - шарнирную область IgG2 (*например*, с двумя или четырьмя цистеинами, которые могут образовывать дисульфидные мостики);
  - шарнирную область IgG3;
  - шарнирную область IgG4;
  - шарнирную область IgG4, содержащую мутацию стелс (*например*, где шарнирные остатки IgG4 EFLG (SEQ ID NO: 95) мутированы в PVA);
  - шарнирную область IgG4, содержащую мутацию убер (*например*, где остатки EFLG (SEQ ID NO: 95) мутированы в GGG), или
  - шарнирную область, содержащую продукт протеолитического расщепления IdeS человеческого Fc;
- и их мультимеры (*например*, гомодимеры).

В одном варианте осуществления изобретения шарнирная область мини-ловушки VEGF содержит или состоит в основном, или состоит из аминокислотной последовательности:

- DKTHTCPRPCRAPVA (SEQ ID NO: 2) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1 стелс Fc);
- DKTHTCPRPCRAPGGG (SEQ ID NO: 3) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1 убер Fc);
- ERKCCVESPCCRAPVA (SEQ ID NO: 4) (см. мини-ловушку VEGF hIgG2 Fc с 4 Cys);
- VECPCCRAPVA (SEQ ID NO: 5) (см. мини-ловушку VEGF hIgG2 Fc с 2 Cys);
- ERKSCDTPPCPCRAPELLG (SEQ ID NO: 6 или ее аминокислоты 6-21 (подчеркнуты)) (см. мини-ловушку VEGF hIgG3 Fc);
- ESKYGPPCCPCRAPEFLG (SEQ ID NO: 7 или ее аминокислоты 4-18 (подчеркнуты)) (см. мини-ловушку VEGF hIgG4 Fc);
- ESKYGPPCCPCRAPVA (SEQ ID NO: 8 или ее аминокислоты 4-17 (подчеркнуты)) (см. мини-ловушку VEGF hIgG4 стелс Fc);
- ESKYGPPCCPCRAPGGG (SEQ ID NO: 9 или ее аминокислоты 4-17 (подчеркнуты)) (см. мини-ловушку VEGF hIgG4 убер Fc);

DKTHTCPRPCRPAPVA (SEQ ID NO: 10) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1-2 химера Fc);

DKTHTCPRPCPGGGFLG (SEQ ID NO: 11) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1 мутация GGGF (SEQ ID NO: 92) Fc);

DKTHTCPRPCPGGGGLG (SEQ ID NO: 12) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1 мутация GGGG (SEQ ID NO: 93) Fc);

DKTHTCPRPCPGGGLLG (SEQ ID NO: 13) (см. мини-ловушку VEGF hIgG1 мутация GGGL (SEQ ID NO: 94) Fc);

DKTHTCPRPCPLLГ (SEQ ID NO: 14) (см. Fc мини-ловушку VEGF hIgG1 делеция (APE)); или

DKTHTCRLCPARELLG (SEQ ID NO: 68),

или шарнирную область любой из MC, представленных в настоящем документе (*например*, любой из SEQ ID NO: 78-86), или любой из тех, которые представлены на любой из фигур 1, 2, 3, 5, 6, 7 или 13-17.

Шарнирная область IgG афлиберцепта (REGN3) и REGN7483 содержит аминокислотную последовательность: DKTHTCPRPCPAPELLG (SEQ ID NO: 1). В одном варианте осуществления изобретения мини-ловушки VEGF и ловушки VEGF, определенные в настоящем документе, применяют при условии, что шарнирная область MC афлиберцепта и/или шарнирная область REGN7483 является/являются исключенными.

Настоящее изобретение также включает ловушки VEGF, которые содержат следующую доменную структуру:

$[(\text{VEGFR1 Ig2})-(\text{VEGFR2 Ig3})]_a$ -мультимеризующий компонент (MC),

или

$[(\text{VEGFR1 Ig2})-(\text{VEGFR2 Ig3})-(\text{VEGFR2 Ig4})]_a$ -мультимеризующий компонент (MC),

где  $a=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  или  $10$ ; и

где MC представляет собой полипептид Fc иммуноглобулина, который включает шарнирную область и сайт расщепления для протеазы, такой как IdeS (но в одном варианте осуществления изобретения Fc не представляет собой IgG1 человека дикого типа). В одном варианте осуществления изобретения MC ловушки VEGF представляет собой Fc человека, который включает:

- шарнирную область IgG1, содержащую мутацию стелс или убер;

- химеру шарнирная область IgG1-шарнирная область IgG2;
  - шарнирную область IgG1 с остатками APEL (SEQ ID NO: 91), которые мутированы (*например*, мутированы в GGGF (SEQ ID NO: 92), GGGG (SEQ ID NO: 93) или GGGL (SEQ ID NO: 94));
  - делецию остатка APE IgG1;
  - шарнирную область IgG2 (*например*, с двумя или четырьмя цистеинами, которые могут образовывать дисульфидные мостики);
  - шарнирную область IgG3;
  - шарнирную область IgG4;
  - шарнирную область IgG4, содержащую мутацию стелс или uber;
- или
- любой из МС, изложенных в настоящем документе.

В одном варианте осуществления изобретения МС ловушки VEGF включает аминокислотную последовательность (где √ представляет собой сайт расщепления протеазой IdeS):

ERKSCDKTHTCPRPCAPPVA√GPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 16 или ее вариант) или ее аминокислоты 6-24 (см. ловушку VEGF hIgG1 стелс Fc);

ERKSCDKTHTCPRPCAPGGG√GPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 17 или ее вариант) или ее аминокислоты 6-24 (см. ловушку VEGF hIgG1 убер Fc);

ERKCCVESCPRPCAPPVA√GPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 18 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-21 или 6-21 (VECPRPCAPPVA√GPSV (SEQ ID NO: 97)) (см. ловушку VEGF hIgG2 Fc с 2Cys или 4Cys);

ERKSCDTPRPCRPCAPELLG√GPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 19 или ее вариант) или ее аминокислоты 6-25 (см. ловушку VEGF hIgG3 Fc);

ESKYGPPCPRPCAPEFLG√GPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 20 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-22 (см. ловушку VEGF hIgG4 Fc);

ESKYGPPCPRPCAPPVA√GPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 21 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-21 (см. ловушку VEGF hIgG4 стелс Fc);

ESKYGPPCPRPCAPGGG√GPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 22 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-21 (см. ловушку VEGF hIgG4 убер Fc);

DKTHTCPRPCAPPVA√GPSV (SEQ ID NO: 70) (см. ловушку VEGF hIgG1 стелс Fc или химера hIgG1-2 Fc);

DKTHTCPRPCPGGGFLG<sup>Y</sup>GPSV (аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 74) (см. ловушку VEGF hIgG1 мутация GGGF (SEQ ID NO: 92) Fc);

DKTHTCPRPCPGGGGLG<sup>Y</sup>GPSV (аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 75) (см. ловушку VEGF hIgG1 мутация GGGG (SEQ ID NO: 93) Fc);

DKTHTCPRPCPGGGLL<sup>Y</sup>GPSV (аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 76) (см. ловушку VEGF hIgG1 мутация GGGL (SEQ ID NO: 94) Fc); или

DKTHTCPRPCPLL<sup>Y</sup>GPSV (аминокислоты 6-22 из SEQ ID NO: 77) (см. ловушку VEGF hIgG1 делеция (APE) Fc).

См., например, фигуру 2.

В одном варианте осуществления изобретения МС ловушки VEGF содержит аминокислотную последовательность:

GPSVFLFPPKPKD<sup>Y</sup>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS<sup>Y</sup>VLTVVHQ  
D<sup>Y</sup>WLN<sup>Y</sup>GKEYKCKVSNKGLPAPIEK<sup>Y</sup>TISK<sup>Y</sup>TGQPREPQVY<sup>Y</sup>TLPPSR<sup>Y</sup>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYK<sup>Y</sup>TPPMLDSDG<sup>Y</sup>SFFLYSKLTV<sup>Y</sup>DKSRWQ<sup>Y</sup>QGNVFSC<sup>Y</sup>SV<sup>Y</sup>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 23);

GPSVFLFPPKPKD<sup>Y</sup>TLMISRTPEVTCVVVDV<sup>Y</sup>QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS<sup>Y</sup>VLTVLHQ  
D<sup>Y</sup>WLN<sup>Y</sup>GKEYKCKVSNKGLPSSIEK<sup>Y</sup>TISKAKGQPREPQVY<sup>Y</sup>TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYK<sup>Y</sup>TPPVLDSDG<sup>Y</sup>SFFLYSKLTV<sup>Y</sup>DKSRWQ<sup>Y</sup>QGNVFSC<sup>Y</sup>SV<sup>Y</sup>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 24);

GPSVFLFPPKPKD<sup>Y</sup>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS<sup>Y</sup>VLTVVHQ  
D<sup>Y</sup>WLN<sup>Y</sup>GKEYKCKVSNKGLPAPIEK<sup>Y</sup>TISK<sup>Y</sup>TGQPREPQVY<sup>Y</sup>TLPPSR<sup>Y</sup>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYK<sup>Y</sup>TPPMLDSDG<sup>Y</sup>SFFLYSKLTV<sup>Y</sup>DKSRWQ<sup>Y</sup>QGNVFSC<sup>Y</sup>SV<sup>Y</sup>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 25);

GPSVFLFPPKPKD<sup>Y</sup>TLMISRTPEVTCVVVDV<sup>Y</sup>QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS<sup>Y</sup>VLTVLHQ  
D<sup>Y</sup>WLN<sup>Y</sup>GKEYKCKVSNKGLPSSIEK<sup>Y</sup>TISKAKGQPREPQVY<sup>Y</sup>TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYK<sup>Y</sup>TPPVLDSDG<sup>Y</sup>SFFLYSRLTV<sup>Y</sup>DKSRWQ<sup>Y</sup>EGNVFSC<sup>Y</sup>SV<sup>Y</sup>MHEALHNHYTQKSLSL<sup>Y</sup>SLGK

(SEQ ID NO: 26);

GPSVFLFPPKPKD<sup>Y</sup>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS<sup>Y</sup>VLTVVHQ  
D<sup>Y</sup>WLN<sup>Y</sup>GKEYKCKVSNKGLPAPIEK<sup>Y</sup>TISK<sup>Y</sup>TGQPREPQVY<sup>Y</sup>TLPPSR<sup>Y</sup>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYK<sup>Y</sup>TPPMLDSDG<sup>Y</sup>SFFLYSKLTV<sup>Y</sup>DKSRWQ<sup>Y</sup>QGNVFSC<sup>Y</sup>SV<sup>Y</sup>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 27);

GPSVFLFPPKPKD<sup>Y</sup>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<sup>Y</sup>VLTVLHQ  
D<sup>Y</sup>WLN<sup>Y</sup>GKEYKCKVSNKALPAPIEK<sup>Y</sup>TISKAKGQPREPQVY<sup>Y</sup>TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYK<sup>Y</sup>TPPVLDSDG<sup>Y</sup>SFFLYSKLTV<sup>Y</sup>DKSRWQ<sup>Y</sup>QGNVFSC<sup>Y</sup>SV<sup>Y</sup>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 28);

GPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 29);

GPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 30); или

GPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 31).

В одном варианте осуществления изобретения ни одна из мини-ловушек VEGF, представленных в настоящем документе, не содержит такой МС.

В одном варианте осуществления изобретения мультимеризующий компонент, который включает шарнирную область Fc-домена или ее вариант или фрагмент (*например*, из IgG4), включает мутацию S108P, *например*, для стимуляции стабилизации димера.

В одном варианте осуществления изобретения ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF по настоящему изобретению содержит модифицированный домен Fc или его фрагмент (*например*, где фрагмент включает шарнирную область), обладающий сниженной эффекторной функцией. Используемый в настоящем документе термин «модифицированный домен Fc, обладающий сниженной эффекторной функцией» означает любую часть Fc иммуноглобулина, которая была модифицирована, мутирована, укорочена и т.д. по сравнению с природным доменом Fc дикого типа, так что молекула, содержащая модифицированный Fc демонстрирует уменьшение тяжести или степени по меньшей мере одного эффекта, выбранного из группы, состоящей из уничтожения клеток (*например*, ADCC и/или CDC), активации комплемента, фагоцитоза и опсонизации, по сравнению с молекулой сравнения, содержащей природную версию части Fc дикого типа. В некоторых вариантах осуществления «модифицированный домен Fc со сниженной эффекторной функцией» представляет собой домен Fc со сниженным или ослабленным связыванием с рецептором Fc (*например*, FcγR).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный домен Fc представляет собой вариант Fc IgG1 или вариант Fc

IgG4, содержащий замену в шарнирной области. Например, модифицированный Fc для применения в контексте настоящего изобретения может содержать вариант Fc IgG1, в котором по меньшей мере одна аминокислота шарнирной области Fc IgG1 заменена соответствующей аминокислотой из шарнирной области Fc IgG2. Альтернативно, модифицированный Fc для применения в контексте настоящего изобретения может содержать вариант Fc IgG4, в котором по меньшей мере одна аминокислота шарнирной области Fc IgG4 заменена соответствующей аминокислотой из шарнирной области Fc IgG2. Неограничивающие примеры модифицированных Fc-областей, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, изложены в публикации заявки на патент США № 2014/0243504, описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки, а также любые функционально эквивалентные варианты модифицированных Fc-областей, представленных в нем.

Другие модифицированные домены Fc и модификации Fc, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают любые модификации, изложенные в US 2014/0171623; US 8697396; US 2014/0134162; WO 2014/043361, описания которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Сконструированный IgG1 со стелс мутацией основан на каркасе IgG1, но с заменой шарнира CPPCPAPELLG (аминокислоты 6-16 из SEQ ID NO: 1) на CPPCPAPPVA (аминокислоты 6-15 из SEQ ID NO: 2) и домена CH2 IgG1 на таковой IgG4. См., *например*, фигуру 13, фигуру 14, фигуру 15, фигуру 16 и фигуру 17.

Сконструированный IgG4 со мутацией стелс имеет замену трех аминокислот (EFLG (SEQ ID NO: 95) на PVA), чтобы походить на шарнирную область IgG2, которая лишена способности связываться с FcγR1, в каркасном участке IgG4 со стабилизированной шарнирной областью (CPPC (SEQ ID NO: 100) или CPSC (SEQ ID NO: 101)), который лишен способности связываться с C1q. См., *например*, фигуру 13, фигуру 14, фигуру 15, фигуру 16 и фигуру 17.

В одном варианте осуществления изобретения ловушка или мини-ловушка VEGF имеет мутацию IgG1 убер или убер стелс в шарнирной области, превращающую CPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 102) в CPPCPAPGGG (SEQ ID NO: 103); или ловушка или мини-ловушка VEGF имеет мутацию IgG4 убер или убер стелс в шарнирной области, превращающую CPPCPAPEFLG (SEQ ID NO: 104) в CPPCPAPGGG (SEQ ID NO: 103).

Ловушка или мини-ловушка VEGF с IgG1 стелс Fc человека или IgG4 стелс Fc человека заменяет аминокислотные остатки в шарнире в VEGF ловушке IgG1, которые

склонны к ответам на уже существующие анти-шарнирные антитела (PEL). Из-за консервативности последовательности между шарнирами IgG этих химерных областей Fc и таковых IgG2 человека, они имеют низкие ответы на уже существующие анти-шарнирные антитела (АНА).

Химерные IgG2/IgG4 Fc ловушки и мини-ловушки VEGF являются частью настоящего изобретения. Эти молекулы сочетают в себе благоприятные свойства обоих изоформ IgG2 и IgG4, и обладают минимальной способностью к эффекторной функции. Известно, что разные изоформы IgG проявляют разные типы и уровни эффекторной функции. Эти различия в значительной степени обусловлены способностью каждой изоформы взаимодействовать с различными FcγR, а также с компонентом комплемента C1q. Изоформы IgG2 и IgG4 демонстрируют пониженную способность генерировать Fc-зависимую эффекторную функцию по сравнению с изоформой IgG1.

Настоящее изобретение также включает мини-ловушки VEGF, которые представляют собой VEGF-связывающий продукт протеолитического расщепления ловушки VEGF по настоящему изобретению, где при расщеплении удаляется часть MC. Например, в одном варианте осуществления изобретения протеолитическое расщепление осуществляется протеазой IdeS (или ее вариантом) или другой протеазой, которая расщепляет перед GPSV (аминокислоты 218-221 из SEQ ID NO: 41).

В одном варианте осуществления изобретения мини-ловушка VEGF по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, как указано ниже:

REGN10103-мини-ловушка VEGF hIgG2 Fc с 4Cys CPPPAPPVA (SEQ ID NO: 105)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKFLSTLTIDGVTRSDQGLTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**ERKCCVECPPCPAPPVA**

(SEQ ID NO: 32);

REGN10105- мини-ловушка VEGF hIgG2 Fc с 2Cys CPPAPAPPVA (SEQ ID NO: 106)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKFLSTLTIDGVTRSDQGLTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**VECPPCPAPPVA**

(SEQ ID NO: 33)

Мини-REGN10104 (mREGN10104)-мини-ловушка VEGF hIgG1 стелс Fc

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTCPPCPAPPVA**

(SEQ ID NO: 34); REGN10104, где домен Fc (или его фрагмент) удален.

Мини-REGN10187 (mREGN10187)-мини-ловушка VEGF hIgG4 стелс Fc

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**ESKYGPPCPPCPAPPVA**

(SEQ ID NO: 35); REGN10187, где домен Fc (или его фрагмент) удален.

Мини-REGN10511 (mREGN10511)-мини-ловушка VEGF hIgG1-2 химера Fc

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTCPPCPAPPVA**

(SEQ ID NO: 36); REGN10511, где Fc-домен (или его фрагмент) удален.

Мини-REGN10512 (mREGN10512)-мини-ловушка VEGF hIgG1 мутация GGGF  
 (SEQ ID NO: 92) Fc

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTCPPCPGGGFLG**

(SEQ ID NO: 37); REGN10512, где Fc-домен (или его фрагмент) удален.

Мини-REGN10513 (mREGN10513)-VEGF мини-ловушка hIgG1 мутация GGGG  
 (SEQ ID NO: 93) Fc

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTCPPCPGGGGLG**

(SEQ ID NO: 38); REGN10513, где Fc-домен (или его фрагмент) удален.

Мини-REGN10514 (mREGN10514 или REGN11095)-мини-ловушка VEGF hIgG1  
 мутация GGGL (SEQ ID NO: 94) Fc

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTCPPCPGGGLL**

(SEQ ID NO: 39); REGN10514, где Fc-домен (или его фрагмент) удален.

Мини-REGN10515 (mREGN10515)-VEGF мини-ловушка hIgG1 делеция (APE)  
 Fc

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTCPPCPDLLG**

(SEQ ID NO: 40); REGN10515, где Fc-домен (или его фрагмент) удален.

См. фигуру 7.

В одном варианте осуществления изобретения ловушка VEGF по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, как указано ниже:

**REGN10102-ловушка VEGF hIgG2 Fc с 2Cys**

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**VECP****PCAPPVAGPSV**FLFP  
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY  
 KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
 PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 41)

**REGN10104-ловушка VEGF hIgG1 стелс Fc**

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTC****PPCPAPPVAGPSV**F  
 LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
 KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 42)

**REGN10117-ловушка VEGF hIgG2 Fc с 4 Cys**

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**ERKCC****VECP****PCAPPVAGPS**  
**V**FLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWL  
 NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
 NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 43)

**REGN10187-ловушка VEGF hIgG4 стелс Fc**

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**ESKYG****PPCP****PCAPPVAGPS**  
**V**FLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
 NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(SEQ ID NO: 44)

**REGN10511-ловушка VEGF hIgG1-2 химера Fc**

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTCPPCPAPPVAGPSVF**  
 LFPPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNG  
 KEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 45)

**REGN10512-ловушка VEGF hIgG1 мутация GGGF (SEQ ID NO: 92) Fc**

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTCPPCPGGGFLGGPSV**  
 FLPPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
 GKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
 YKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 46)

**REGN10513-ловушка VEGF hIgG1 мутация GGGG (SEQ ID NO: 93) Fc**

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTCPPCPGGGGLGGPSV**  
 FLPPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
 GKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
 YKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 47)

**REGN10514-ловушка VEGF hIgG1 мутация GGGL (SEQ ID NO: 94) Fc**

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTCPPCPGGGLGGPSV**  
 FLPPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
 GKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
 YKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 48)

**REGN10515-ловушка VEGF hIgG1 делеция (APE) Fc**

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**DKTHTCPPCPLLGGPSVFLF**  
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
 TTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 49)

Такие ловушки VEGF расщепляются протеазой IdeS. Мини-ловушки VEGF, которые являются продуктом такого расщепления, являются частью настоящего изобретения. См. фигуру 7.

Сравнения последовательностей между различными ловушками VEGF и мини-ловушками VEGF представлены на фигурах 5 и 6.

«Вариант» полипептида (*например*, вариант полипептида, включающий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID No: 32-49), относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере примерно на 70-99,9% (*например*, 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%) идентичной или подобной эталонной аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе; когда сравнение выполняется с помощью алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы обеспечить максимальное совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (*например*, ожидаемый порог: 10; размер слова: 3; максимальное количество совпадений в диапазоне запросов: 0; матрица BLOSUM 62; штрафы за гэпы: наличие 11, расширение 1; корректировка матрицы условного композиционного веса выравнивания). В одном варианте осуществления изобретения вариант полипептида относится к полипептиду, содержащему около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 точечных мутаций (*например*, аминокислотные замены, делеции и/или вставки) по сравнению с эталонной аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе. Ловушки и мини-ловушки VEGF, имеющие аминокислотные последовательности, которые являются вариантами любой из представленных в настоящем документе, являются частью настоящего изобретения.

Следующие ссылки относятся к алгоритмам BLAST, часто используемым для анализа последовательности: BLAST ALGORITHMS: Altschul *et al.* (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109; Altschul, S. F., *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T. L., *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S. F., *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., *et al.*, (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J. C., *et al.*, (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J. M. *et al.*, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M. O., *et al.*, "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M. O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl.

Biomed. Res. Found., Washington, D.C.; Schwartz, R. M., *et al.*, "Matrices for detecting distant relationships." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3." M. O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.; Altschul, S. F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D. J., *et al.*, (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S. F., *et al.*, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., *et al.*, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; and Altschul, S. F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York.

Как указано в настоящем документе, термины "REGN10104"; "mREGN10104"; "REGN10102"; "REGN10105"; "REGN10117"; "REGN10103"; "REGN10187"; "mREGN10187"; "REGN10511"; "mREGN10511"; "REGN10512"; "mREGN10512"; "REGN10513"; "mREGN10513"; "REGN10514"; "REGN11095"; "REGN10515"; "mREGN10515" относятся к соответствующим ловушкам VEGF и мини-ловушкам VEGF, включая полипептиды, которые включают аминокислотные последовательности, описанные в настоящем документе под этими названиями, а также их варианты; и/или мультимеры (*например*, гомодимеры), включающие два или более таких полипептидов.

В одном варианте осуществления изобретения мини-ловушка VEGF, как указано в настоящем документе, характеризуется в соответствии с любым одним или несколькими из следующего:

- связывается с VEGF<sub>165</sub> или VEGF<sub>121</sub> человека, *например*, с VEGF<sub>165</sub> с  $K_D$  около 1 или 2, или 1-2 пМ (*например*, около 0,74 пМ, 0,8, 0,86, 0,865 пМ, 1 пМ, 1,1 пМ, 1,08 пМ, 1,78 пМ, 2,6 пМ, 1,89 пМ, 1,37 пМ, 1,08 пМ, 1,82 пМ или 1,37 пМ) или большей аффинностью, *например*, при 25°C, *например*, где указанную аффинность измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса, *например*, в присутствии от около 2,5 нМ до около 0,078 пМ человеческого VEGF<sub>165</sub>;

- имеет  $IC_{50}$  около  $1-2 \times 10^{-11}$  М для блокирования VEGF<sub>121</sub> и/или VEGF<sub>165</sub> активации VEGFR1 и/или VEGFR2, *например*, как измерено в клетках HEK293, экспрессирующих рецептор VEGF (*например*, где внеклеточный домен слит с цитоплазматическим доменом IL18Ralpha или IL18Rbeta), *например*, также имеющий репортерный ген NFκappaB-люцифераза-IRES-eGFP. *Например*,  $IC_{50}$  около  $1-2,5 \times 10^{-11}$

М для блокирования (i) VEGF<sub>165</sub> (при 40 пМ) активации VEGFR1 (*например*, около  $1,06 \times 10^{-11}$ М или около  $2,19 \times 10^{-11}$ М); (ii) VEGF<sub>165</sub> (при 20 пМ) активации VEGFR2 (*например*, около  $2,46 \times 10^{-11}$ М или около  $2,39 \times 10^{-11}$ М); (iii) VEGF<sub>121</sub> (при 40 пМ) активации VEGFR1 (*например*, около  $1,74 \times 10^{-11}$ М или около  $2,16 \times 10^{-11}$ М); (iv) VEGF<sub>121</sub> (при 60 пМ) активации VEGFR2 (*например*, около  $1,80 \times 10^{-11}$ М или около  $2,30 \times 10^{-11}$ М);

- проявляет меньшую иммуногенность в образцах сыворотки, полученных от обезьян ранее не подвергаемых лечению, и/или в образцах исходной сыворотки человека с AMD/DME, чем у REGN7483, *например*, при измерении с помощью анализа антител против лекарственного средства (ADA), *например*, электрохимиллюминесцентного иммуноанализа, мостикового анализ, *например*, где указанные мини-ловушки VEGF метят биотином и рутением, *например*, где ADA связывает меченную биотином и рутением мини-ловушку VEGF, образуя мостик, при этом меченная биотином мини-ловушка VEGF связана с покрытой стрептавидином поверхностью планшета, *например*, при этом электрический ток активирует меченное рутением лекарственное средство с выработкой электрохемилюминесцентного сигнала, указывающего на присутствие комплекса. См. краткое описание формата анализа на фигуре 11 (A);

- образует комплекс 1:1 с гомодимером VEGF<sub>165</sub> (REGN10105 : гомодимер VEGF<sub>165</sub> или REGN11095 : гомодимер VEGF<sub>165</sub>) (*например*, в соотношении 6 мкМ : 2 мкМ; 2 мкМ : 2 мкМ или 2 мкМ : 6 мкМ мини-ловушка VEGF : гомодимер VEGF<sub>165</sub>);

- образует комплекс 1:1:2 с гомодимером VEGF<sub>165</sub> и анти-VEGF Fab REGN18 (REGN10105 : гомодимер VEGF<sub>165</sub> : REGN18);

- уменьшает неоваскуляризацию сетчатки при интравитреальном введении (*например*, при около 0,125, 0,025, 0,25 или 2,5 мкг на глаз) в мышинной модели OIR (*например*, по сравнению с мышами, которым вводили Fc человека), *например*, при измерении под плоским препаратом сетчатки;

- обладает более коротким интравитреальным периодом полураспада (*например*, около 3,4 или 3,9 дней), чем афлиберцепт в глазах кроликов (*например*, новозеландских белых кроликов) при интравитреальном введении (*например*, при около 0,115, 0,146 или 0,147 мкг на глаз), *например*, где мини-ловушка VEGF составлена в 10 мМ гистидине, *например*, где мини-ловушка VEGF конъюгирована с красителем AF488;

- проявляет меньшее системное воздействие (*например*, уровни свободных молекул в плазме) при интравитреальном введении, *например*, в дозе 5,5 мг/глаз, чем афлиберцепт (*например*, в дозе 4 мг/глаз) (*например*, у приматов, отличных от человека

(NHP)). Например, имеет концентрацию свободной молекулы в плазме около 0,1 или 0,2 или 0,1-0,2 мкг/мл (или менее), *например*, NHP, примерно через 336 часов после инъекции (*например*, однократной инъекции) около 5,5 мг/глаз;

- не накапливается в плазме (*например*, в виде свободной или связанной с VEGF молекулы), *например*, у примата, отличного от человека, после многократных интравитреальных инъекций (*например*, 4, *например*, примерно каждые 28 дней), *например*, около 5,5 мг/глаз;

- проявляет большую стабильность, чем афлиберцепт, в стрессовых условиях, таких как повышенная температура, *например*, 37°C, *например*, в течение 4 недель в приблизительно эквимольных условиях. Например, при 90 мг/мл образуется около 3-4% (*например*, 3,5, 3,6, 3,7, 3,74, 4,0 или 4,1) высокомолекулярных соединений (НМВ) в неделю (*например*, в течение 4 недель при 37°C); и/или при 120 мг/мл образуется около 5-6% (*например*, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,5, 5,7 или 5,9) высокомолекулярных соединений (НМВ) в неделю (*например*, в течение 4 недель при 37°C); например, тогда как афлиберцепт в дозе 140 мг/мл вырабатывает около 5,6% высокомолекулярных соединений (НМВ) в неделю (*например*, в течение 4 недель при 37°C); или, например, тогда как REGN7483<sup>F</sup> вырабатывает около 5-6% (*например*, 5,4, 5,45, 5,5, 5,6) высокомолекулярных НМВ в неделю (*например*, в течение 4 недель при 37°C) при 90 мг/мл. Мини-ловушка REGN7483<sup>F</sup> создается путем расщепления афлиберцепта под действием FabRICATOR;

- не проявляет значительных изменений в уровнях агрегации после примерно 15 минут встряхивания со скоростью около 1000 об/мин и/или двух циклов свободного оттаивания (*например*, примерно при 90 мг/мл или 120 мг/мл);

- обладает меньшей вязкостью, чем REGN7483, *например*, около 5,8 при 90 мг/мл или 12,1 сП при 120 мг/мл (*например*, при 20°C); например, тогда как REGN7483 имеет вязкость около 6,9 сП при 90 мг/мл; или 12,1 сП при 120 мг/мл, или, например, тогда как REGN7483 имеет вязкость около 14,5 сП при 120 мг/мл (*например*, в присутствии гистидина при 20°C), *например*, где мини-ловушка VEGF представляет собой REGN10105;

- проявляет большую фотостабильность, чем REGN7483, *например*, демонстрирует увеличение НМВ примерно на 8,7% (по сравнению с контрольными образцами в темноте)/млн люкс\*ч (*например*, где мини-ловушка VEGF представляет собой REGN10105); тогда как, например, REGN7483 демонстрирует увеличение НМВ примерно на 9,5% (по сравнению с контрольными образцами в темноте)/млн люкс\*час,

*например*, при концентрации примерно 10 мг/мл, *например*, где свет представляет собой холодный белый свет и/или ультрафиолетовый свет;

- в композиции, содержащей ловушки VEGF и/или мини-ловушку VEGF (*например*, имеющей шарнирную область IgG2), такие молекулы гликозилированы N-гликанами (например, фукозилированы, сиалилированы, галактозилированы, маннозилированы или модифицированы бисектным N-гликаном) таким образом, что примерно 43-45% от общего содержания N-гликанов имеют остаток коровой фукозы, примерно 64-72% от общего содержания N-гликанов имеют по меньшей мере один остаток галактозы, примерно 20-27% от общего содержания N-гликанов имеют по меньшей мере один остаток сиаловой кислоты, примерно 19-25% идентифицированы как имеющие высокое содержание маннозы (*например*, Man5) и/или примерно 1,6-1,9% от общего содержания N-гликанов представляют собой бисектные гликаны; например, где такие молекулы гликозилированы N-гликанами, так что примерно 43,3% от общего содержания N-гликанов имеют остаток коровой фукозы, примерно 64,4% от общего содержания N-гликанов имеют по меньшей мере один остаток галактозы, примерно 20% от общего содержания N-гликанов имеют по меньшей мере один остаток сиаловой кислоты, примерно 25,2% идентифицированы как имеющие высокое содержание маннозы (*например*, Man5), и/или примерно 1,6% от общего содержания N-гликанов представляют собой бисектные гликаны (*например*, где мини-ловушка VEGF представляет собой REGN10103); или такие молекулы гликозилированы N-гликанами, так что примерно 44,8% от общего содержания N-гликанов имеют остаток коровой фукозы, примерно 71,6% от общего содержания N-гликанов имеют по меньшей мере один остаток галактозы, примерно 26,5% от общего содержания N-гликанов имеют по меньшей мере один остаток сиаловой кислоты, примерно 18,6% идентифицированы как имеющие высокое содержание маннозы (*например*, Man5) и/или примерно 1,9% от общего содержания N-гликанов представляют собой бисектные гликаны (*например*, где мини-ловушка VEGF представляет собой REGN10105);

- один или несколько серинов или треонинов ловушки или мини-ловушки VEGF являются O-гликозилированными;

- один или несколько аспарагинов ловушки или мини-ловушки VEGF являются дезамидированными;

- один или несколько мотивов аспартат-глицин ловушки или мини-ловушки VEGF превращаются в изо-аспартат-глицин и/или Asn-Gly;

- один или несколько метионинов ловушки или мини-ловушки VEGF являются окисленными;
- один или несколько триптофанов ловушки или мини-ловушки VEGF превращаются в N-формилкинуренин;
- один или несколько аргининов ловушки или мини-ловушки VEGF превращаются в Arg 3-дезоксиглюкозон;
- C-концевой остаток (*например*, глицин или аланин) ловушки или мини-ловушки VEGF отсутствует;
- в ловушке или мини-ловушке VEGF имеется один или несколько негликозилированных сайтов гликозилирования;
- ловушка или мини-ловушка VEGF является ксилозилированной;
- ловушка или мини-ловушка VEGF гликирована по лизину;
- ловушка или мини-ловушка VEGF содержит цистин со свободной тиольной группой;
- ловушка или мини-ловушка VEGF содержит дисульфидный мостик внутри цепи;
- ловушка или мини-ловушка VEGF содержит дисульфидные мостики в параллельной или перекрестной ориентации; и/или
- ловушка или мини-ловушка VEGF содержит лизин или аргинин, которые являются карбоксиметилированными.

См., *например*, Guidance for Industry Q1B Photostability Testing of New Drug Substances and Products, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), November 1996.

Ловушки VEGF и мини-ловушки VEGF, представленные в настоящем документе (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515), также могут быть гликозилированы (*например*, N-связанные и/или O-связанные гликаны). Например, в одном варианте осуществления изобретения ловушка или мини-ловушка VEGF сиалилирована, галактозилирована и/или фукозилирована в одном или нескольких сайтах. В одном варианте осуществления изобретения ловушка или мини-ловушка VEGF содержит один или несколько N-связанных гликанов с 5 остатками маннозы (Man5). В одном варианте

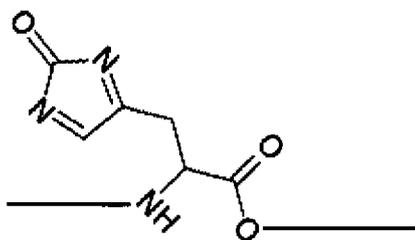
осуществления изобретения ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF включает гликозилирование, которое обычно добавляют к молекуле, которая экспрессируется в клетке яичника китайского хомяка (CHO) (гликозилирование клетки CHO). См., *например*, Carillo *et al.*, Glycosylation Analysis of Therapeutic Glycoproteins Produced in CHO Cells, *Methods Mol Biol.* 2017; 1603:227-241; or Hossler *et al.*, Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture, *Glycobiology* 19(9): 936–949 (2009). В одном варианте осуществления изобретения ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF представляет собой композицию, включающую гетерогенную смесь гликозилированных вариантов ловушки или мини-ловушки. Отдельные молекулы ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF могут отличаться от других в композиции в отношении их конкретного паттерна гликозилирования. Например, около 47% молекул могут быть сиалилированы, около 70% молекул могут быть галактозилированы, около 36% молекул могут быть фукозилированы и/или около 11% молекул могут быть гликозилированы Man-5. В одном варианте осуществления изобретения композиция, содержащая ловушки VEGF и/или мини-ловушки VEGF, имеет профиль гликанов, состоящий из примерно 43,3% фукозилированных, примерно 64,4% галактозилированных, примерно 20% сиалилированных, примерно 25,2% гликанов с высоким содержанием маннозы и примерно 1,6% бисектных N-гликанов (например, где мини-ловушка VEGF представляет собой REGN10103); или имеет профиль гликанов, состоящий из примерно 44,8% фукозилированных, примерно 71,6% галактозилированных, примерно 26,5% сиалилированных, примерно 18,6% гликанов с высоким содержанием маннозы и примерно 1,9% бисектных N-гликанов (*например*, где мини-ловушка VEGF представляет собой REGN10105).

См., *например*, Yu *et al.*, Production, characterization, and pharmacokinetic properties of antibodies with N-linked mannose-5 glycans, *MAbs.* Jul-Aug 2012;4(4):475-87.

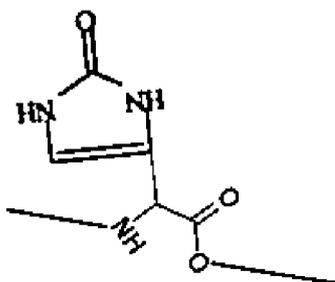
В одном из вариантов осуществления изобретения REGN10105 является N-гликозилированным (*например*, как описано в настоящем документе) по одному или нескольким подчеркнутым N остаткам, указанным ниже:  
 SDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSPE<sup>N</sup>ITVTLKKFPLD<sup>T</sup>LIPDGKRIIWDSRKGFIIS<sup>N</sup>ATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTN<sup>N</sup>YLTHRQT<sup>N</sup>TIIDVVLSPSHGIELSVGEKLV<sup>N</sup>L<sup>N</sup>CTARTELVGIDFNWEY<sup>N</sup>PSSKHQ<sup>N</sup>HKKL  
 VNRDLKTQSGSEM<sup>N</sup>KKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK<sup>N</sup>KN<sup>N</sup>STFVRVHEKVECP<sup>N</sup>PCAPPVA (SEQ ID  
 NO: 33). Соответствующие N-остатки в других ловушках и мини-ловушках VEGF, описанных в настоящем документе, могут быть аналогичным образом N-гликозилированы.

В одном варианте осуществления изобретения один или несколько гистидинов в ловушке или мини-ловушке VEGF, как указано в настоящем документе, представляют собой 2-оксогистидин.

Могут быть получены два химических варианта 2-оксо-гистидина (2-оксо-his),



, имеющий молекулярную массу, которая на 13,98 Да выше по сравнению с гистидином (вариант 13,98 Да); или



, имеющий молекулярную массу, которая на 15,99 Да выше по сравнению с гистидином (вариант 15,99 Да); где вариант 2-оксо-гистидина с 13,98 Да является преобладающим фрагментом, наблюдаемым в мини-ловушке, экспрессируемой в CDM. Содержание варианта 2-оксо-гистидина с 13,98 Да в пептиде можно оценить спектрофотометрически, поскольку этот фрагмент имеет повышенное поглощение света при длине волны 350 нМ, тогда как вариант с 15,99 Да не имеет такого повышенного поглощения. Образование варианта 2-оксогистидина с 13,98 Да в мини-ловушке может катализироваться светом, тогда как образование варианта с 15,99 Да может катализироваться металлом, таким как медь ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

Окисление триптофана может дать сложную смесь продуктов. Первичными продуктами могут быть N-формилкинуруенин и кинуруенин, а также продукты моноокисления, диокисления и/или триокисления. Пептиды, несущие окисленные модификации Тгр, обычно демонстрируют увеличения массы на 4, 16, 32 и 48 Да, соответствующие образованию кинуруенина (KYN), гидрокситриптофана ( $W_{\text{ox1}}$ ) и N-формилкинуруенина/дигидрокситриптофана (NFK/ $W_{\text{ox2}}$ , называемого также как «дважды окисленный Тгр»), тригидрокситриптофана ( $W_{\text{ox3}}$ , называемого также как «трижды окисленный Тгр») и их комбинаций, таких как гидрокскинуруенин ( $\text{KYN}_{\text{ox1}}$ , +20 Да). Окисление до гидрокситриптофана ( $W_{\text{ox1}}$ ) (Mass spectrometric identification of

oxidative modifications of tryptophan residues in proteins: chemical artifact or post-translational modification? J Am Soc Mass Spectrom. 2010 Jul; 21(7): 1114–1117). Подобно триптофану, окисление тирозина в первую очередь дает 3,4-дигидроксифенилаланин (DOPA) и дитирозин (Li, S, C Schoneich, and RT. Borchardt. 1995. Chemical Instability of Protein Pharmaceuticals: Mechanisms of Oxidation and Strategies for Stabilization. Biotechnol. Bioeng. 48:490-500).

Объем настоящего изобретения включает композиции, в которых около 0,1-2% (или менее, например, 0,1% или менее, или 0,05% или 0,01%) гистидинов в мини-ловушках или ловушках VEGF в композиции представляют собой 2-оксо-гистидин.

### **ИДЕИ И ИХ ВАРИАНТЫ**

Настоящее изобретение включает мини-ловушки VEGF и их композиции, которые были получены путем протеолитического расщепления афлиберцепта под действием *Streptococcus pyogenes* IdeS (FabRICATOR) и его вариантов. FabRICATOR коммерчески доступен от фирмы Genovis, Inc.; Cambridge, MA; Lund, Sweden.

В одном варианте осуществления полипептид IdeS содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 70% идентичностью последовательности по всей длине выделенной аминокислотной последовательности, как указано в группе, состоящей из SEQ ID NO: 50-65. В одном аспекте выделенная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности по всей длине выделенной аминокислотной последовательности. В другом аспекте выделенная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере около 90% идентичности последовательности по всей длине выделенной аминокислотной последовательности. В другом аспекте выделенная аминокислотная последовательность имеет примерно 100% идентичности последовательности по всей длине выделенной аминокислотной последовательности. В одном аспекте полипептид может быть способен расщеплять целевой белок на фрагменты. В конкретном аспекте целевой белок представляет собой IgG. В другом конкретном аспекте целевой белок представляет собой слитый белок. В еще одном конкретном аспекте фрагменты могут содержать Fab-фрагмент и/или Fc-фрагмент.

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность IdeS содержит исходную аминокислотную последовательность, определяемую

```
MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPP
ANFTQGEDVFNAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIK
RYLEENPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYEFKEKAFPYLSKHLGVFPD
```

HVIDMFINGYRLSLTNNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLK  
EISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDNGNLKAIYVTDSDSNASIGM  
KKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 66), но имеющую остаток аспарагина в положении 87, 130, 182 и/или 274, мутированный в аминокислоту, отличную от аспарагина. В одном аспекте мутация может придавать повышенную химическую стабильность при щелочных значениях pH по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью. В другом аспекте мутация может приводить к увеличению химической стабильности на 50% при щелочных значениях pH по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью. В одном аспекте аминокислота может быть выбрана из аспарагиновой кислоты, лейцина и аргинина. В конкретном аспекте остаток аспарагина в положении 87 мутирован в остаток аспарагиновой кислоты. В другом конкретном аспекте остаток аспарагина в положении 130 мутирован в остаток аргинина. В еще одном конкретном аспекте остаток аспарагина в положении 182 мутирован в остаток лейцина. В еще одном конкретном аспекте остаток аспарагина в положении 274 мутирован в остаток аспарагиновой кислоты. В еще одном конкретном аспекте мутирован остаток аспарагина в положениях 87 и 130. В еще одном конкретном аспекте мутирован остаток аспарагина в положениях 87 и 182. В еще одном конкретном аспекте мутирован остаток аспарагина в положениях 87 и 274. В еще одном конкретном аспекте мутирован остаток аспарагина в положениях 130 и 182. В еще одном конкретном аспекте мутирован остаток аспарагина в положениях 130 и 274. В еще одном конкретном аспекте мутирован остаток аспарагина в положениях 182 и 274. В еще одном конкретном аспекте мутирован остаток аспарагина в положениях 87, 130 и 182. В еще одном конкретном аспекте мутирован остаток аспарагина в положениях 87, 182 и 274. В еще одном конкретном аспекте мутирован остаток аспарагина в положениях 130, 182 и 274. В еще одном конкретном аспекте мутирован остаток аспарагина в положениях 87, 130, 182 и 274.

Афлиберцепт или другую ловушку VEGF можно расщепить с помощью IdeS, иммобилизованной на твердом носителе, *например*, на хроматографической частице. Например, образец, содержащий ловушку VEGF в забуференном водном растворе (в буфере для расщепления), может быть нанесен на иммобилизованную IdeS, например, в хроматографической колонке. Колонку можно инкубировать, *например*, в течение 30 минут, *например*, при температуре около 18°C. Затем колонку можно промыть буфером для расщепления. После расщепления растворы для расщепления и промывки можно

наносить на колонку с белком А для улавливания расщепленного побочного продукта Fc, при этом продукт мини-ловушки остается в проточной фракции. В варианте осуществления изобретения буфер для расщепления и/или растворы для уравнивания и промывки через колонку с белком-А имеют pH 7, *например*, 40 мМ Tris, 54 мМ ацетат, pH 7,0 ± 0,1. Такие способы изготовления мини-ловушки VEGF являются частью настоящего изобретения.

В варианте осуществления изобретения вариант IdeS включает аминокислотную последовательность, указанную ниже:

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
 NQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDS  
 KLFYEFKEKAFPYLSLTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
 DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
 NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 50);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
 NQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDS  
 KLFYEFKEKAFPYLSLTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
 DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
 NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 51);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
 NQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDS  
 KLFYEFKEKAFPYLSLTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
 DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
 NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 52);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
 NQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDS  
 KLFYEFKEKAFPYLSLTKHLGVFPDHVIDMFIILGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
 DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
 NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 53);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
 NQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDS  
 KLFYEFKEKAFPYLSLTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
 DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
 NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 54);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSF SANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
NQGWDYDITKTFDGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFRGEQMFVKEAIDTKNHQLDS  
KLF EYFKEKAFPYLS TKHLGVFPDHVIDMFINGYRSLT NHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 55);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSF SANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
NQGWDYDITKTFDGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFRGEQMFVKEAIDTKNHQLDS  
KLF EYFKEKAFPYLS TKHLGVFPDHVIDMFILGYRSLT NHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 56);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSF SANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
NQGWDYDITKTFDGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFRGEQMFVKEAIDTKNHQLDS  
KLF EYFKEKAFPYLS TKHLGVFPDHVIDMFINGYRSLT NHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 57);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSF SANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
NQGWDYDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFRGEQMFVKEAIDTKNHQLDS  
KLF EYFKEKAFPYLS TKHLGVFPDHVIDMFILGYRSLT NHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 58);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSF SANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
NQGWDYDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFRGEQMFVKEAIDTKNHQLDS  
KLF EYFKEKAFPYLS TKHLGVFPDHVIDMFINGYRSLT NHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 59);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSF SANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
NQGWDYDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFRGEQMFVKEAIDTKNHQLDS  
KLF EYFKEKAFPYLS TKHLGVFPDHVIDMFILGYRSLT NHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 60);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSF SANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
NQGWDYDITKTFDGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFRGEQMFVKEAIDTKNHQLDS  
KLF EYFKEKAFPYLS TKHLGVFPDHVIDMFILGYRSLT NHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH

DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 61);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
NQGWDITKTFDQKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFVKEAIDTKNHQLDS  
KLFYEFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 62);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
NQGWDITKTFDQKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFVKEAIDTKNHQLDS  
KLFYEFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI LGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 63);

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
NQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFVKEAIDTKNHQLDS  
KLFYEFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI LGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 64); или

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVA  
NQGWDITKTFDQKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFVKEAIDTKNHQLDS  
KLFYEFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI LGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH  
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGV  
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

(SEQ ID NO: 65).

Такие варианты IdeS обладают повышенной химической стабильностью при щелочных значениях pH по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 66).

Настоящее изобретение включает композиции, включающие мини-ловушку VEGF, описанную в настоящем документе, и соответствующую ловушку VEGF, которую использовали для получения продукта мини-ловушки VEGF посредством расщепления под действием IdeS. Ловушка VEGF в смеси представляет собой расщепленный или еще не расщепленный реагент для протеолиза с помощью IdeS. Например, композиция может включать:

- ловушку VEGF REGN10102 и мини-ловушку VEGF REGN10105;
- ловушку VEGF REGN10104 и мини-ловушку VEGF mREGN10104;

- ловушку VEGF REGN10117 и мини-ловушку VEGF REGN10103;
- ловушку VEGF REGN10187 и мини-ловушку VEGF mREGN10187;
- ловушку VEGF REGN10511 и мини-ловушку VEGF mREGN10511;
- ловушку VEGF REGN10512 и мини-ловушку VEGF mREGN10512;
- ловушку VEGF REGN10513 и мини-ловушку VEGF mREGN10513;
- ловушку VEGF REGN10514 и мини-ловушку VEGF REGN11095; и/или
- ловушку VEGF REGN10515 и мини-ловушку VEGF mREGN10515.

В одном варианте осуществления изобретения имеется больше (*например*, молей или грамм) мини-ловушки VEGF, чем ловушки VEGF, например, в 2, 5, 10 или 15 раз больше. Такая композиция может дополнительно включать IdeS или ее вариант, *например*, как указано в настоящем документе. IdeS может либо отсутствовать, либо присутствовать только в следовых количествах, *например*, 0,04 ppm (частей на миллион) (или менее) или менее 0,3 ppm. Композиция может также включать буфер и/или другие компоненты, способствующие расщеплению протеазой.

## **ПОЛИНУКЛЕТИДЫ, ВЕКТОРЫ, КЛЕТКИ-ХОЗЯЕВА И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ**

Выделенный полинуклеотид, кодирующий любые полипептиды ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, представленные в настоящем документе, составляет часть настоящего изобретения, как и вектор, содержащий полинуклеотид, и/или клетка-хозяин (*например*, клетка яичника китайского хомячка (CHO)), содержащая полинуклеотид, вектор, ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF и/или полипептид, представленные в настоящем документе. Такие клетки-хозяева также составляют часть настоящего изобретения.

Полинуклеотид включает ДНК и РНК. Настоящее изобретение включает любой полинуклеотид по настоящему изобретению, например, кодирующий полипептид ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, представленный в настоящем документе (*например*, любую из SEQ ID NO: 32-49). Необязательно, полинуклеотид функционально связан с промотором или другой последовательностью контроля экспрессии. В одном варианте осуществления изобретения полинуклеотид по настоящему изобретению слит с последовательностью сигнала секреции. Полипептиды, кодируемые такими полинуклеотидами, также входят в объем настоящего изобретения.

В варианте осуществления изобретения полинуклеотид, кодирующий REGN10103, содержит нуклеотидную последовательность:

AGTGATACCGGTAGACSTTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAG  
 CTCGTCATTCCTGCCGGTTACGTACACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTTGATC  
 CCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGG  
 CTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAAATATCTCACACATCGACAAAACCAATACA  
 ATCATAGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGGAATTGAACTATCTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATTGTACA  
 GCAAGAACTGAACTAAATGTGGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCCTTCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTT  
 GTAAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTTGAGCACCTTAACTATAGATGGTGT  
 ACCCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACATTTGTC  
 AGGGTCCATGAAAAGGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCCACCCGTGCCCAGCACCCACCTGTGGCATGA

(SEQ ID NO: 71)

В варианте осуществления изобретения полинуклеотид, кодирующий REGN10105, содержит нуклеотидную последовательность:

AGTGATACCGGTAGACSTTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAG  
 CTCGTCATTCCTGCCGGTTACGTACACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTTGATC  
 CCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGG  
 CTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAAATATCTCACACATCGACAAAACCAATACA  
 ATCATAGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGGAATTGAACTATCTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATTGTACA  
 GCAAGAACTGAACTAAATGTGGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCCTTCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTT  
 GTAAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTTGAGCACCTTAACTATAGATGGTGT  
 ACCCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACATTTGTC  
 AGGGTCCATGAAAAGGTGAGTGCCACCCGTGCCCAGCACCCACCTGTGGCATGA

(SEQ ID NO: 72)

В варианте осуществления изобретения полинуклеотид, кодирующий REGN11095, содержит нуклеотидную последовательность:

AGTGATACCGGTAGACSTTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAG  
 CTCGTCATTCCTGCCGGTTACGTACACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTTGATC  
 CCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGG  
 CTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAAATATCTCACACATCGACAAAACCAATACA  
 ATCATAGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGGAATTGAACTATCTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATTGTACA  
 GCAAGAACTGAACTAAATGTGGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCCTTCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTT  
 GTAAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTTGAGCACCTTAACTATAGATGGTGT  
 ACCCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACATTTGTC  
 AGGGTCCATGAAAAGGACAAAATCAGCATGCCACCCGTGCCCAGGCGGTGGACTTCTAGGGTGA

(SEQ ID NO: 73)

В общем, «промотор» или «промоторная последовательность» представляет собой регуляторную область ДНК, способную связывать РНК-полимеразу в клетке

(например, непосредственно или через другие связанные с промотором белки или вещества) и инициировать транскрипцию кодирующей последовательности. Промотор может быть функционально связан с другими последовательностями, регулирующими экспрессию, включая последовательности энхансера и репрессора, и/или с полинуклеотидом по изобретению. Промоторы, которые могут быть использованы для контроля экспрессии генов, включают, но без ограничения, промотор цитомегаловируса (CMV) (патенты США № 5385839 и 5168062), область раннего промотора SV40 (Benoist, *et al.*, (1981) *Nature* 290:304-310), промотор, содержащийся в 3'-концевом повторе вируса саркомы Рауса (Yamamoto, *et al.*, (1980) *Cell* 22:787-797), промотор тимидинкиназы герпеса (Wagner, *et al.*, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445), регуляторные последовательности гена металлотioneина (Brinster, *et al.*, (1982) *Nature* 296:39-42); прокариотические векторы экспрессии, такие как промотор бета-лактамазы (VIIIa-Komaroff, *et al.*, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3727-3731), или составленной промотор (*tac*) (DeBoer, *et al.*, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25); см. также "Useful proteins from recombinant bacteria" in *Scientific American* (1980) 242:74-94; и промоторные элементы на основе дрожжей или других грибов, такие как промотор Gal4, промотор ADC (алкоголдегидрогеназы), промотор PGK (фосфоглицеролкиназы) или промотор щелочной фосфатазы.

Полинуклеотид, кодирующий полипептид, «функционально связан» с промотором или другой последовательностью контроля экспрессии, когда в клетке или другой системе экспрессии последовательность направляет опосредованную РНК-полимеразой транскрипцию кодирующей последовательности в РНК, предпочтительно мРНК, которая затем может подвергаться сплайсингу РНК (если она содержит интроны) и, необязательно, транслироваться в белок, кодируемый кодирующей последовательностью.

Настоящее изобретение включает полинуклеотиды, кодирующие полипептидные цепи ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF, которые являются вариантами тех, чья аминокислотная последовательность специально указана в настоящем документе (например, любая из SEQ ID NO: 32-49).

Эукариотические и прокариотические клетки-хозяева, включая клетки млекопитающих, могут быть использованы в качестве хозяев для экспрессии полипептида ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF (например, любой из SEQ ID NO: 32-49). Такие клетки-хозяева хорошо известны в данной области, и многие из них доступны в Американской коллекции типовых культур (ATCC). Эти клетки-хозяева

включают, среди прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), CHO K1, EESYR, NICE, NS0, Sp2/0, клетки эмбриональной почки и клетки ВНК. Клетки-хозяева включают грибковые клетки, такие как *Pichia*, например, *Pichia pastoris*, или бактериальные клетки, например, *E.coli*. Настоящее изобретение включает выделенную клетку-хозяина (например, клетку CHO или любой тип клетки-хозяина, указанный выше), содержащую один или несколько полипептидов ловушек или мини-ловушек VEGF (или их вариант) и/или полинуклеотид, кодирующий такой полипептид(ы) (например, как обсуждается в настоящем документе). Полинуклеотид, кодирующий ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF, или их вектор, может быть эктопически или хромосомно интегрирован в хромосомную ДНК или клетку-хозяина.

Трансформация может быть осуществлена любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают опосредованную декстраном трансфекцию, преципитацию фосфатом кальция, опосредуемую полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(ов) в липосомах, биолистическую инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в клетки млекопитающих с помощью вирусных векторов. Способы трансформации клеток хорошо известны в данной области. См., например, патенты США 4399216; 4912040; 4740461 и 4959455. Таким образом, настоящее изобретение включает рекомбинантные способы изготовления ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, включающие следующие стадии:

(i) культивирование клетки-хозяина (например, CHO или *Pichia* или *Pichia pastoris*) в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида, кодирующего ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF (например, в биореакторе, например, в среде с определенным химическим составом (CDM) или не-CDM) и,

(ii) необязательно выделение ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, или их цепи из клетки-хозяина и/или среды, в которой выращивается клетка-хозяин.

В одном варианте осуществления изобретения способ включает стадию введения в клетку-хозяина одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих полипептид ловушки или мини-ловушки VEGF (например, включающий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 32-49), например, где полинуклеотид находится в векторе; и/или интегрируется в хромосому клетки-хозяина и/или функционально связан с промотором. При изготовлении ловушки

VEGF или мини-ловушки VEGF, которые включают две или более полипептидных цепей, коэкспрессия цепей в одной клетке-хозяине приводит к ассоциации цепей, *например*, в клетке, или на клеточной поверхности, или вне клетки, если такие цепи секретируются, с образованием гомодимерной мини-ловушки VEGF. Настоящее изобретение также включает ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, которые являются продуктом способов получения, изложенных в настоящем документе, и, необязательно, способов очистки, изложенных в настоящем документе.

Рекомбинантные ловушки VEGF и мини-ловушки VEGF (*например*, любая из SEQ ID NO: 32-49) являются частью настоящего изобретения, *например*, которые являются продуктом такого способа.

См., *например*, Ling *et al.*, Development and manufacturability assessment of chemically-defined medium for the production of protein therapeutics in CHO cells, Biotechnol Prog Sep-Oct 2015;31(5):1163-71.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ изготовления ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF (*например*, гомодимерной мини-ловушки VEGF), описанной в настоящем документе, из ловушки VEGF, содержащий, состоящий или по существу состоящий из протеолиза ловушки VEGF протеазой, которая расщепляет ловушку VEGF в мультимеризующемся Fc-компоненте иммуноглобулина ниже (к C-концевой стороне) шарнирного домена Fc, так что нижний шарнир или его часть является частью продукта мини-ловушки VEGF. Например, протеолиз можно проводить с помощью *S.pyogenes* IdeS (*например*, протеаза FabRICATOR; Genovis, Inc.; Cambridge, MA; Lund, Sweden) или подвиды *Streptococcus equi zooepidemicus* IdeZ (New England Biolabs; Ipswich, MA). В варианте осуществления изобретения в таком способе отсутствуют какие-либо стадии, которые включают значительную модификацию аминокислотных остатков такого полипептида мини-ловушки VEGF (*например*, направленную химическую модификацию, такую как пегилирование или йодоацетамидирование) и/или восстановление дисульфидного мостика. Мини-ловушка VEGF по такому способу изготовления также является частью настоящего изобретения.

За таким способом изготовления мини-ловушки VEGF может следовать способ очистки мини-ловушки VEGF, *например*, от примесей, таких как Fc-фрагмент, протеолитический фермент или другой материал. В варианте осуществления изобретения способ очистки проводят в условиях, способствующих образованию гомодимерной мини-ловушки VEGF (*например*, в невозстанавливающих условиях,

*например*, в отсутствие восстанавливающих агентов, таких как дитиотреитол (DTT) или бета-меркаптоэтанол). Мини-ловушка VEGF по такому способу изготовления и/или способу очистки также является частью настоящего изобретения. В одном варианте осуществления изобретения очистку проводят способом, включающим хроматографическую очистку.

Также, в настоящем изобретении обеспечен выделенный полипептид, содержащий, состоящий или по существу состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 32-49. Композиции, содержащие такие полипептиды, *например*, в которых все или часть таких полипептидов связаны, например, в гомодимерные комплексы ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, которые могут связываться с VEGF, являются частью настоящего изобретения. Такие композиции могут включать, например, одну или несколько клеток-хозяев, протеазу (*например*, IdeS) и культуральную среду.

Биореакторы, такие как резервуарные биореакторы или одноразовые биореакторы, можно использовать для культивирования клеток-хозяев для экспрессии ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF. Такие биореакторы могут включать импеллер (*например*, турбинного, морского или спирального типа) для смешивания культур и средства для контроля температуры, pH, содержания кислорода и/или азота в культуральной среде. Объемы биореактора могут быть исследовательскими (*например*, 250 мл или 2 литра) или производственными (*например*, 2000 литров или 10000 литров). Настоящее изобретение включает резервуарный биореактор, который содержит ловушку VEGF и/или мини-ловушку VEGF по изобретению (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) и, необязательно, клетки-хозяева (*например*, как описано в настоящем документе) и/или культуральную среду (*например*, CDM). См., *например*, Innovations in Cell Culture, BioProcess Vol. 12(suppl 5) (Sept. 2014).

### **КОМБИНАЦИИ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОСТАВЫ**

Настоящее изобретение обеспечивает композиции, которые включают ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514;

REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) в сочетании с одним или несколькими ингредиентами; а также способы их применения и способы изготовления таких композиций. Фармацевтические составы, содержащие мини-ловушку VEGF и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, являются частью настоящего изобретения. В одном варианте осуществления изобретения фармацевтический состав по настоящему изобретению имеет рН приблизительно 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 или 6,2.

Для изготовления фармацевтических составов ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) мини-ловушки смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом. См., *например*, Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1984); Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, N.Y.; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. В одном варианте осуществления изобретения фармацевтический состав является стерильным. Такие композиции являются частью настоящего изобретения.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению включают ловушку VEGF или мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) и фармацевтически приемлемый носитель, включая, например, воду, буферные агенты, консерванты и/или детергенты.

Объем настоящего изобретения включает высушенные, *например*, лиофилизированные, композиции, содержащие мини-ловушку VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512;

REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) или его фармацевтический состав, который включает фармацевтически приемлемый носитель, но практически не содержит воды.

В еще одном варианте осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент, который вводят субъекту в сочетании с мини-ловушкой VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515), раскрытый в настоящем документе, вводят субъекту в соответствии с Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57th edition (Nov. 1, 2002)).

В настоящем изобретении предложен сосуд (*например*, пластиковый или стеклянный флакон, *например*, с крышкой или хроматографической колонкой, иглой с полым отверстием или цилиндром шприца), содержащий любую из ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) или фармацевтический состав, содержащий его фармацевтически приемлемый носитель. Настоящее изобретение также обеспечивает инъекционное устройство, содержащее ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF, или состав, указанный в настоящем документе, *например*, шприц, предварительно заполненный шприц или автоинжектор. В варианте осуществления изобретения сосуд окрашен (*например*, в коричневый или зеленый цвет), чтобы блокировать свет.

Настоящее изобретение включает комбинации, включающие ловушку VEGF или мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. Ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF и дополнительный терапевтический агент могут быть в единой композиции или в отдельных композициях. *Например*, в одном варианте осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой олигонуклеотид (*например*, олигонуклеотид, снижающий экспрессию VEGF, *например*, антисмысловый олигонуклеотид), ингибитор Ang-2 (*например*, несвакумаб), активатор рецептора Tie-2,

антитело против PDGF или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело против рецептора PDGF или рецептора бета PDGF или его антигенсвязывающий фрагмент и/или дополнительный антагонист VEGF, такой как афлиберцепт, конберцепт, бевацизумаб, ранибизумаб, аптамер против VEGF, такой как пегаптаниб (*например*, пегаптаниб натрия), однопочечное (*например*, VL-VH) антитело против VEGF, такое как бролуцизумаб, DARPin против VEGF, такой как Abicipar Pegol DARPin, биспецифическое антитело против VEGF, *например*, которое также связывается с ANG2, такое как RG7716, или растворимая форма рецептора-3 фактора роста эндотелия сосудов человека (VEGFR-3), содержащая внеклеточные домены 1-3, экспрессируемая в виде Fc-слитого белка.

### **ВВЕДЕНИЕ И ЛЕЧЕНИЕ**

Настоящее изобретение обеспечивает способы лечения или предупреждения рака (*например*, рост и/или метастазирование которого опосредовано, по меньшей мере частично, VEGF, *например*, VEGF-опосредованный ангиогенез) или ангиогенного заболевания глаз у субъекта, включающий введение терапевтического количества ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) субъекту.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения рака (*например*, рост и/или метастазирование которого опосредовано, по меньшей мере частично, VEGF, *например*, VEGF-опосредованный ангиогенез) или ангиогенного заболевания глаз у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF, указанных в настоящем документе, и необязательно дополнительного терапевтического агента в организм субъекта, *например*, в глаз субъекта. Выражение «ангиогенное заболевание глаз», используемое в настоящем документе, означает любое заболевание глаз, которое вызвано или связано с ростом или пролиферацией кровеносных сосудов или просачиванием кровеносных сосудов. В одном варианте осуществления изобретения введение осуществляют путем интравитреальной инъекции. Неограничивающие примеры ангиогенных заболеваний глаз, которые поддаются лечению или профилактике с использованием описанных в настоящем документе способов, включают:

- возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD) (*например*, влажную или сухую, предпочтительно влажную),

- макулярный отек, \
- макулярный отек после окклюзии вен сетчатки,
- окклюзия вен сетчатки (RVO),
- окклюзия центральной вены сетчатки (CRVO),
- окклюзия ветвей вены сетчатки (BRVO),
- диабетический макулярный отек (DME),
- хориоидальную неоваскуляризацию (CNV),
- неоваскуляризацию радужки,
- неоваскулярную глаукому,
- послеоперационный фиброз при глаукоме,
- пролиферативную витреоретинопатию (PVR),
- неоваскуляризация диска зрительного нерва,
- неоваскуляризацию роговицы,
- неоваскуляризацию сетчатки,
- витреальную неоваскуляризацию,
- паннус,
- птеригиум,
- сосудистую ретинопатию,
- диабетическую ретинопатию у субъекта с диабетическим макулярным отеком; и

- диабетические ретинопатии (*например*, непролиферативная диабетическая ретинопатия (*например*, характеризующаяся уровнем тяжести диабетической ретинопатии (DRSS) около 47 или 53) или пролиферативная диабетическая ретинопатия; *например*, у субъекта, который не страдает DME или центральным DME).

Термин «лечить» или «лечение» относится к терапевтической мере, которая обращает вспять, стабилизирует или устраняет нежелательное заболевание или нарушение (*например*, ангиогенное заболевание глаз или рак), например, вызывая регрессию, стабилизацию или устранение одного или нескольких симптомов или признаков такого заболевания или расстройства в любой клинически измеримой степени, например, в отношении ангиогенного заболевания глаз, вызывая снижение или поддержание показателя тяжести диабетической ретинопатии (DRSS), улучшая

или поддерживая зрение (например, остроту зрения с наилучшей коррекцией, например, измеренной по увеличению букв ETDRS), увеличение или сохранение поля зрения и/или уменьшение или сохранение центральной толщины сетчатки, а в отношении рака прекращение или реверсирование роста, выживания и/или метастазирование раковых клеток в субъект. Как правило, терапевтическая мера представляет собой введение одной или нескольких доз терапевтически эффективного количества ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF субъекту с заболеванием или нарушением.

Эффективное или терапевтически эффективное количество ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) для лечения или профилактики рака (*например*, который по меньшей мере частично опосредован ангиогенезом) или ангиогенного заболевания глаз относится к количеству ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, достаточному для того, чтобы вызвать регрессию, стабилизацию или устранение рака или ангиогенного заболевания глаз, например, путем регрессии, стабилизации или устранения одного или нескольких симптомов или признаков рака, или ангиогенного заболевания глаза в любой клинически измеримой степени, например, в отношении ангиогенного заболевания глаз, путем вызывания снижения или поддержания степени тяжести диабетической ретинопатии (DRSS) за счет улучшения или поддержания зрения (например, остроты зрения с максимальной коррекцией, например, измеряемой увеличением ETDRS букв), увеличение или поддержание поля зрения и/или уменьшение или сохранение центральной толщины сетчатки и, в отношении рака, остановку или реверсирование роста, выживания и/или метастазирования раковых клеток у субъекта. В варианте осуществления изобретения эффективное или терапевтически эффективное количество ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF для лечения или профилактики ангиогенного заболевания глаз составляет около 0,5-25 мг, например, не более чем около 100 мкл. Количество может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому подлежит введение, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. В некоторых вариантах осуществления за начальной дозой может следовать введение второй или множества последующих доз ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF в количестве, которое может быть примерно таким же,

меньшим или большим, чем начальная доза, при этом последующие дозы разделены интервалом от примерно 1 до примерно 8 недель.

Режим введения ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) или их композиции может варьироваться. Пути введения включают парентеральный, непарентеральный, пероральный, ректальный, чресслизистый, кишечный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный, интрамедуллярный, интратекальный, прямой внутрижелудочковый, внутривенный, внутрибрюшинный, интраназальный, внутриглазной, ингаляционный, инсуффляционный, местный, кожный, внутриглазной, интравитреальный, трансдермальный или внутриартериальный.

Настоящее изобретение обеспечивает способы введения ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) субъекту, включающие введение ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF или их фармацевтического состава в организм субъекта. Например, в варианте осуществления изобретения способ включает прокалывание тела субъекта, *например*, иглой шприца, и введение ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF или их фармацевтического состава в тело субъекта, *например*, в глаз, вену, артерию, мышечную ткань или подкожный слой субъекта.

В одном варианте осуществления изобретения интравитреальная инъекция фармацевтического состава по настоящему изобретению (который включает ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF по настоящему изобретению (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) включает стадию прокола глаза шприцем и иглой (*например*, иглой для инъекций 30-го калибра), содержащей состав, и введение состава (*например*, менее или равного примерно 100 микролитрам) в стекловидное тело глаза (*например*, с объемом, достаточным для доставки терапевтически эффективного количества, как указано в настоящем документе, *например*, около 0,5-20 мг мини-ловушки VEGF). Необязательно способ включает стадии введения местного анестетика (*например*, пропаракаина, лидокаина

или тетракаина), антибиотика (*например*, фторхинолона), антисептика (*например*, повидон-йода) и/или агента, расширяющего зрачок, в глаз, который подвергается инъекции. В одном варианте осуществления изобретения перед инъекцией создается стерильное поле вокруг глаза, в которое делается инъекция. В одном варианте осуществления изобретения после интравитреальной инъекции субъекта наблюдают на предмет повышения внутриглазного давления, воспаления и/или артериального давления.

Термин «в сочетании с» указывает, что компоненты, ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF по настоящему изобретению (*например*, REGN10104; mREGN10104; REGN10102; REGN10105; REGN10117; REGN10103; REGN10187; mREGN10187; REGN10511; mREGN10511; REGN10512; mREGN10512; REGN10513; mREGN10513; REGN10514; REGN11095; REGN10515; или mREGN10515) вместе с другим агентом, таким как анти-ANG2, могут быть составлены в одну композицию, *например*, для одновременной доставки, или могут быть составлены по отдельности в две или более композиций (*например*, набор, включающий каждый компонент). Компоненты, вводимые в сочетании друг с другом, можно вводить субъекту в другое время, чем при введении другого компонента; например, каждое введение можно проводить не одновременно (*например*, отдельно или последовательно) с интервалами в течение заданного периода времени. Отдельные компоненты, вводимые в сочетании друг с другом, также можно вводить по существу одновременно (*например*, точно в одно и то же время или через неклинически значимый период времени) во время одного и того же сеанса введения. Кроме того, отдельные компоненты, вводимые в сочетании друг с другом, могут быть введены субъекту одним и тем же или другим путем.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» относится к млекопитающему (*например*, крысе, мыши, кошке, собаке, корове, овце, лошади, козе, кролику), предпочтительно человеку, например, нуждающемуся в предупреждении и/или лечении рака или ангиогенного заболевания глаз. Субъект может иметь рак или ангиогенное заболевание глаз, или быть предрасположенным к развитию рака или ангиогенного заболевания глаз.

В одном варианте осуществления изобретения любой способ, включающий стадию интравитреальной инъекции ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF по настоящему изобретению, например, для лечения или профилактики ангиогенного заболевания глаз, не приводит к значительному увеличению внутриглазного давления и/или артериального давления.

### ПРИМЕРЫ

Эти примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения и не являются его ограничением. Композиции и способы, изложенные в примерах, составляют часть настоящего изобретения.

#### **Пример 1: Анализ кинетики связывания ловушек VEGF и мини-ловушек VEGF и VEGF на поверхности, захваченной рецептором.**

Оценивали характеристики связывания различных ловушек VEGF и мини-ловушек VEGF.

**Таблица 1-1. Ловушки VEGF и мини-ловушки VEGF**

REGN#	Ловушка или мини-ловушка VEGF
REGN110	VEGF <sub>165</sub> человека
REGN3	Ловушка VEGF hIgG1 Fc (афлиберцепт)
REGN7483	Мини-ловушка VEGF hIgG1 Fc
REGN10104	Ловушка VEGF hIgG1 стелс Fc
mREGN10104	Мини-ловушка VEGF hIgG1 стелс Fc
REGN10102	Ловушка VEGF hIgG2 Fc с 2 Cys
REGN10105	Мини-ловушка VEGF hIgG2 Fc с 2 Cys
REGN10117	Ловушка VEGF hIgG2 Fc с 4 Cys
REGN10103	Мини-ловушка VEGF hIgG2 Fc с 4 Cys
REGN10187	Ловушка VEGF hIgG4 стелс Fc
mREGN10187	Мини-ловушка VEGF hIgG4 стелс Fc
REGN10514	Ловушка VEGF hIgG1 мутация GGGL (SEQ ID NO: 94) Fc
REGN11095	Мини-ловушка VEGF hIgG1 мутация GGGL_(SEQ ID NO: 94) Fc

REGN3=SDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIS  
 NATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPS  
 SKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPC240

PAPPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  
 VLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
 EWESNGQPENNYK403TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 69)

**Экспериментальная процедура (включает описание соответствующих клеточных линий, белков, реагентов, а также типа и модели прибора).**

Равновесные константы диссоциации (значения  $K_D$ ) для связывания человеческого VEGF<sub>165</sub> с различными конструкциями мини-ловушек очищенного VEGF определяли с помощью анализа в реальном времени на основе биосенсора поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore 3000. Все исследования по связыванию проводили в подвижном буфере (HBS-ET), содержащем 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4, при 25°C. Сначала поверхность сенсора Biacore дериватизировали с помощью аминного сочетания с моноклональным мышинным антителом против VEGFR1 (REGN18) для захвата конструкций мини-ловушек VEGF. Исследования по связыванию проводили со следующими реагентами человеческого VEGF: человеческий VEGF<sub>165</sub>. Различные концентрации реагента VEGF<sub>165</sub> готовили в рабочем буфере HBS-ET (2,5 нМ-0,078 пМ; 2-кратное серийное разведение для человеческого VEGF<sub>165</sub>) и затем вводили на поверхность анти-VEGFR1 захваченных конструкций мини-ловушек VEGF в течение 108 секунд со скоростью потока 90 мкл/мин. Диссоциацию связанного реагента VEGF<sub>165</sub> из конструкций мини-ловушек VEGF отслеживали в течение 60 минут в рабочем буфере HBS-ET. Константы скорости реакции ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем приближения сенсограмм в реальном времени к 1:1 модели связывания с помощью программного обеспечения для приближенного изображения функций Scrubber 2.0с. Равновесные константы диссоциации связывания ( $K_D$ ) и полупериоды диссоциации ( $t^{1/2}$ ) рассчитывали из констант скорости реакции следующим образом:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad \text{и} \quad t^{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Параметры кинетики связывания человеческого VEGF<sub>165</sub> с различными конструкциями мини-ловушек VEGF при 25°C приведены в таблице 1-2 и таблице 1-3. Все мини-ловушки VEGF показали кинетику связывания, сравнимую с афлиберцептом REGN3.

**Таблица 1-2. Параметры кинетики связывания человеческого VEGF<sub>165</sub> с различными конструкциями мини-ловушек VEGF при 25°C**

VEGF ловушка или мини-ловушка	REGN#	IgG человека	Уровень захвата ловушки/мини-ловушки (RU)	2,5 нМ связанного hVEGF <sub>165</sub> (RU)	ka(1/Мс)	kd(1/с)	K <sub>D</sub> (М)	t <sub>1/2</sub> (мин)
Ловушка	REGN3	IgG1	15,8 ± 0,1	4,7	9,70E+06	1,70E-05	1,80E-12	679
Мини-ловушка	REGN7483	IgG1	17,0 ± 0,1	9,37	1,01E+07	1,95E-05	1,90E-12	591
Ловушка	REGN10104	IgG1 стелс	21,1 ± 0,2	7,3	9,20E+06	1,01E-05	1,10E-12	1149
Мини-ловушка	mREGN10104	IgG1 стелс	20,7 ± 0,1	12,2	9,50E+06	1,70E-05	1,78E-12	681
Ловушка	REGN10102	IgG2 с 2 cys	18,6 ± 0,2	6,6	1,06E+07	2,77E-05	2,60E-12	417
Мини-ловушка	REGN10105	IgG2 с 2 cys	19,7 ± 0,2	10,5	7,62E+06	1,44E-05	1,89E-12	801
Ловушка	REGN10117	IgG2 с 4 cys	14,7 ± 0,1	4,2	7,30E+06	≤ 1e-5	1,37E-12	≥ 1155
Мини-ловушка	REGN10103	IgG2 с 4 cys	23,9 ± 0,3	14,8	9,30E+06	≤ 1e-5	1,08E-12	≥ 1155
Ловушка	REGN10187	IgG4 стелс	26,4 ± 0,3	10,5	9,50E+06	1,73E-05	1,82E-12	668
Мини-ловушка	mREGN10187	IgG4 стелс	25,1 ± 0,3	14,3	7,30E+06	≤ 1e-5	1,37E-12	≥ 1155
Ловушка	REGN10514	hIgG1-GGGL (SEQ ID NO: 94)						
Мини-ловушка	REGN11095	hIgG1-GGGL (SEQ ID NO: 94)						

**Таблица 1-3. Параметры кинетики связывания человеческого VEGF<sub>165</sub>, связывающегося с различными конструкциями мини-ловушек VEGF при 25°C (дополнительные измерения) («GGGL», раскрытая как SEQ ID NO: 94, и «CPPAPAPPVA», раскрытая как SEQ ID NO: 106)**

Ловушка/мини-ловушка VEGF	Конструкция	Захватенная ловушка VEGF (RU)	2 нМ Связанный VEGF <sub>165</sub> (RU)	ка (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	t1/2 (мин)
REGN11095	Мини-ловушка	30±0,5	19,4	1,16E+0,7	≤1e-5	8,60E-13	≥1155
REGN11095 (Alexa 488)	VEGF hlgG1 мутация GGGL (расщепленная)	24±0,2	14,9	1,16E+0,7	≤1e-5	8,60E-13	≥1155
REGN10105	Мини-ловушка	29±0,2	20,4	9,30E+0,6	≤1e-5	1,08E-12	≥1155
REGN10105 (Alexa 488)	VEGF hlgG2 Fc с 2cys CPPAPPVA (расщепленная)	24±0,1	18,0	1,36E+0,7	≤1e-5	7,40E-13	≥1155
REGN3	Ловушка VEGF	32±0,6	12,0	9,98E+0,6	≤1e-5	1,00E-12	≥1155

**Пример 2: Оценка способности мини-ловушек VEGF блокировать активацию VEGFR1 и VEGFR2 с помощью VEGF<sub>165</sub> или VEGF<sub>121</sub> в биологическом анализе на основе люциферазы**

Оценивали способность различных ловушек VEGF и мини-ловушек VEGF блокировать активацию VEGFR.

**Таблица 2-1. Ловушки VEGF и мини-ловушки VEGF**

REGN#	Описание
	Человеческий VEGF <sub>121</sub>
REGN110	Человеческий VEGF <sub>165</sub>
REGN3	Ловушка VEGF hIgG1 Fc (афлиберцепт)
REGN7483	Мини-ловушка VEGF hIgG1 Fc
REGN10104	Ловушка VEGF hIgG1 Fc Стелс
mREGN10104	Мини-ловушка VEGF hIgG1 Fc стелс
REGN10102	Ловушка VEGF hIgG2 Fc с 2 Cys
REGN10105	Мини-ловушка VEGF hIgG2 Fc с 2 Cys
REGN10117	Ловушка VEGF hIgG2 Fc с 4 Cys

REGN10103	Мини-ловушка VEGF hIgG2 Fc с 4 Cys
REGN10187	Ловушка VEGF hIgG4 стелс Fc
mREGN10187	Мини-ловушка VEGF hIgG4 стелс Fc
REGN10514	Ловушка VEGF hIgG1 мутация GGGL (SEQ ID NO: 94) Fc
REGN11095	Мини-ловушка VEGF hIgG1 мутация GGGL (SEQ ID NO: 94) Fc

**Экспериментальная методика (включает описание соответствующих клеточных линий, белков, реагентов, а также типа и модели прибора)**

Линия клеток

Были созданы две клеточные линии для измерения сигнального пути лиганда через VEGFR1 и VEGFR2, соответственно. Для VEGFR1 клон V3H9 HEK293/D9/Flt(1-7)-IL18R $\alpha$ /Flt-IL18R $\beta$  был сконструирован с помощью двух химерных рецепторов, включающих внеклеточный домен VEGFR1 Flt1(1-7), слитый с цитоплазматическим доменом IL18R $\alpha$  или IL18R $\beta$ . Химерные рецепторы трансфицировали в клеточную линию с интегрированным репортерным геном NF $\kappa$ B-люцифераза-IRES-eGFP. Внеклеточный домен VEGFR1 димеризуется при связывании с VEGF, что приводит к взаимодействию внутриклеточных доменов IL18R $\alpha$  и IL18R $\beta$ , передаче сигналов NF $\kappa$ B и последующей продукции люциферазы. Аналогично, для VEGFR2, HEK293/D9/Flk(1-7)-IL18R $\alpha$ /Flt-IL18R $\beta$  был сконструирован с помощью двух химерных рецепторов, включающих внеклеточный домен VEGFR2 Flk1(1-7), слитый с цитоплазматическим доменом IL18R $\alpha$  или IL18R $\beta$ .

Методика анализа

Клетки HEK293/D9/Flt-IL18R $\alpha$ /Flt-IL18R $\beta$  (VEGFR1) или HEK293/D9/Flk(1-7)-IL18R $\alpha$ /Flt-IL18R $\beta$  (VEGFR2) высевали в 96-луночные белые непрозрачные планшеты (Nunc, номер по каталогу 136101) при плотности 10000 клеток/луночку в среде OptiMEM (INVITROGEN, номер по каталогу 31985) с 0,5% FBS (Seradigm, номер по каталогу 1500-500) и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. На следующий день клетки по-разному обрабатывали серийными разведениями 1:3 белков VEGF Trap или Mini Trap в диапазоне концентраций от 5000 пМ до 0,085 пМ с

последующим добавлением фиксированной концентрации белка лиганда VEGF<sub>121</sub> (R&D SYSTEMS номер по каталогу 4644-VS) или VEGF<sub>165</sub> (REGN110) при 40 пМ и инкубировали в течение 6 часов при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Затем к клеткам добавляли субстрат люциферазы One-Glo (PROMEGA, номер по каталогу E6130) и измеряли люминесценцию с использованием планшет-ридера VICTOR™ X5 Multilabel plate reader (PerkinElmer, модель 2030-0050). Данные анализировали с использованием 4-параметрического логистического уравнения по 11-точечной кривой отклика с помощью программного обеспечения GraphPad Prism software для определения значений EC<sub>50</sub> и IC<sub>50</sub>.

### **Обобщенные результаты и выводы**

VEGF<sub>121</sub> активирует клетки HEK293/D9/Flt-IL18R $\alpha$ /Flt-IL18R $\beta$  (VEGFR1) или HEK293/D9/Flk(1-7)-IL18R $\alpha$ /Flt-IL18R $\beta$  (VEGFR2) со значениями EC<sub>50</sub> ~30 пМ (фигура 8 и фигура 9, а также таблица 2-2).

Все мини-ловушки VEGF ингибировали опосредованную 20 пМ VEGF<sub>121</sub> активацию VEGFR1 или VEGFR2 со значениями IC<sub>50</sub>, сходными с наблюдаемыми для полноразмерной ловушки VEGF REGN3 (фигура 8 и фигура 9, а также таблица 2-2 и таблица 2-3).

**Таблица 2-2. Биологический анализ активности мини-ловушек VEGF, блокирующих VEGF<sub>121</sub> или VEGF<sub>165</sub> в клетках VEGFR1 и VEGFR2**

Ловушка или мини- ловушка VEGF	REGN#	Человеческий IgG	Ингибирование 20пМ VEGF <sub>121</sub> IC50 (M)		Ингибирование 20пМ VEGF <sub>165</sub> IC50 (M)	
			Анализ VEGFR1	Анализ VEGFR2	Анализ VEGFR1	Анализ VEGFR2
Ловушка	REGN3	IgG1	2,15E-11	2,14E-11	3,10E-11	3,21E-11
Мини-ловушка	REGN7483	IgG1	2,09E-11	2,37E-11	3,36E-11	4,03E-11
Ловушка	REGN10104	IgG1 стелс	1,91E-11	1,77E-11		
Мини-ловушка	mREGN10104	IgG1 стелс	1,34E-11	1,60E-11		
Ловушка	REGN10102	IgG2 с 2cys	1,43E-11	1,72E-11		
Мини-ловушка	REGN10105	IgG2 с 2cys	1,68E-11	1,79E-11		
Ловушка	REGN10117	IgG2 с 4cys	2,02E-11	1,82E-11		
Мини-ловушка	REGN10103	IgG2 с 4cys	2,11E-11	2,02E-11		
Ловушка	REGN10187	IgG4 стелс	1,25E-11	1,64E-11		
Мини-ловушка	mREGN10187	IgG4 стелс	1,32E-11	1,63E-11		

Ловушка	REGN10514	hIgG1-GGGL (SEQ ID NO: 94)				
Мини-ловушка	REGN11095	hIgG1-GGGL (SEQ ID NO: 94)				

**Таблица 2-3. Биологический анализ активности мини-ловушек VEGF, блокирующих VEGF<sub>121</sub> или VEGF<sub>165</sub> в клетках VEGFR1 и VEGFR2 (дополнительные измерения)**

IC50 Таблица (M)				
	VEGFR1 40пМ VEGF165 (REGN110)	VEGFR1 40пМ R&D VEGF121	VEGFR2 20пМ VEGF165 (REGN110)	VEGFR2 60пМ R&D VEGF121
REGN3	1,49E-11	1,12E-11	2,16E-11	1,52E-11
REGN10105	1,06E-11	1,74E-11	2,46E-11	1,80E-11
REGN11095	2,19E-11	2,16E-11	2,39E-11	2,30E-11
Изотип IgG1	ND	ND	ND	ND

**Пример 3: Определение относительной эффективности расщепления вариантов VEGF-Трап, опосредованного протеазой Ides, с использованием анализа SDS-PAGE**

Определяли способность различных ловушек VEGF расщепляться протеазой IdeS.

**Таблица 3-1. Ловушки VEGF и мини-ловушки VEGF**

REGN#	Подробное описание конструкции	
REGN3	Полноразмерная VEGF Трап, афлиберцепт	VEGF ловушка hIgG1 изотип
REGN10102	Полноразмерная ловушка VEGF	VEGF ловушка hIgG2 Fc с 2 cys
REGN10511	Полноразмерная ловушка VEGF	VEGF ловушка hIgG1-2 химера Fc
REGN10512	Полноразмерная ловушка VEGF	VEGF ловушка hIgG1 мутация GGGF (SEQ ID NO: 92) Fc
REGN10514	Полноразмерная ловушка VEGF	VEGF ловушка hIgG1 мутация GGGL (SEQ ID NO: 94) Fc
REGN10515	Полноразмерная ловушка VEGF	VEGF ловушка hIgG1 делеция (APE) Fc

**Экспериментальная методика (включая описание соответствующих клеточных линий, белков, реагентов, а также типа и модели прибора)**

Относительную эффективность расщепления различных конструкций ловушек VEGF, опосредованного протеазой Ides, определяли с помощью анализа SDS-PAGE. Все исследования по расщеплению проводили в буфере, содержащем 10 мМ фосфата натрия, 40 мМ хлорида натрия, 0,03% полисорбата 20 и 5% сахарозы, pH 6,2, при комнатной температуре. Различные конструкции ловушек VEGF сначала нормализовали по отношению к 0,1 мг/мл в масштабе 0,1 мг. Для каждой конструкции ловушки VEGF аликвоты образцов объемом 100 мкл готовили из нормализованного запаса в 5 повторностях. Затем ко всем образцам добавляли протеазу Stock Ides (0,1 мг/мл) в соотношении 5 нг протеазы/мкг ловушки VEGF. Образцы инкубировали в течение периодов, составляющих 0, 1, 2, 4 и 24 часа. Расщепление останавливали в каждый момент времени путем добавления 0,1 мл исходного буфера на основе амина с pH 2,8. Образцы, собранные в указанные моменты времени, группировали по типу варианта ловушки VEGF, а затем 2 мкг каждого образца гидролизата анализировали с помощью SDS-PAGE с использованием 4-20% трис-глицинового геля в невосстанавливающих условиях. Каждый гель запускали в течение 1 часа при постоянном токе 300 мА. Для последующего окрашивания каждого геля использовали краситель Simply-Blue Safe-Stain. Обесцвеченные гели анализировали визуальным путем, чтобы установить относительную эффективность опосредованного протеазой Ides расщепления каждого варианта ловушки VEGF в течение времени инкубации. Степень эффективности расщепления определяли путем сравнения относительных уровней нерасщепленного димера ловушки VEGF, частично расщепленного димера ловушки VEGF, полностью расщепленного димера ловушки VEGF (мини-ловушки VEGF) и фрагмента Fc мономера. Затем ранжировали относительную эффективность расщепления среди вариантов ловушек VEGF на основании степени наблюдаемого опосредованного Ides расщепления.

Анализ SDS-PAGE опосредованного протеазой IdeS расщепления каждого протестированного варианта ловушки VEGF показан на фигуре 10 (A-F).

**Пример 4: Анализ мини-ловушек VEGF на реакционную способность в отношении уже существующих анти-шарнирных антител (АНА)**

Определяли реакционную способность различных мини-ловушек VEGF в отношении уже существующих анти-шарнирных антител человека и обезьяны.

**Таблица 3-1. Мини-ловушки VEGF**

<b>Мини-ловушка</b>	<b>Человеческий IgG</b>	<b>Подробное описание</b>
REGN7483	IgG1	Ферментативно отщепляется от афлиберцепта
mREGN10104	IgG1 стелс	Ферментативно отщепляется от ловушки VEGF-IgG1s
REGN10105	IgG2 (2Cys)	Рекомбинантно экспрессируется в CHO
REGN10105	IgG2 (2Cys)	Ферментативно отщепляется от ловушки VEGF-IgG2
REGN10103	IgG2 (4Cys)	Ферментативно отщепляется от ловушки VEGF-IgG2
mREGN10187	IgG4 стелс	Ферментативно отщепляется от ловушки VEGF-IgG4s

**Экспериментальная методика (включая описание соответствующих клеточных линий, белков, реагентов, а также типа и модели прибора)**

Потенциальную иммуногенность мини-ловушек VEGF по отношению к уже существующим анти-шарнирным антителам (АНА) оценивали в анализе антител против лекарственных средств (ADA). См. иллюстрацию формата анализа на фигуре 11 (А). Этот анализ ADA представляет собой мостиковый электрохимиллюминесцентный иммуноанализ (ECL), в котором для формирования мостика используются лекарственные средства, меченные биотином и рутением (мини-ловушки). Антитело против лекарственного средства связывается с мечеными биотином и рутением лекарственными средствами (мини-ловушка VEGF), образуя мостиковый комплекс, который затем захватывается поверхностью планшета, покрытой стрептавидином. Электрический ток активирует лекарственное средство, меченное рутением, для выработки электрохимиллюминесцентного сигнала.

В этом анализе тестировали шесть мини-ловушек VEGF с использованием 48 исходных образцов сыворотки человека с AMD/DME и 24 образца сыворотки обезьян, ранее не подвергавшихся лечению. Моноклональное антитело против VEGFR1 (REGN18) использовали в качестве положительного контроля. Результаты представлены в обобщенном виде на фигуре 11(В) и фигуре 12.

**Обобщенные результаты и выводы**

Данные показали, что уже существующие анти-шарнирные антитела (АНА) в образцах сыворотки обезьян, не получавших ранее лечение, или в образцах исходной сыворотки человека с AMD/DME не распознавали конструкции мини-ловушек VEGF, за исключением REGN7483 (hIgG1), которая продемонстрировала переменный диапазон подсчетов. Положительное контрольное mAb против VEGFR1 показало среднее число в диапазоне 6858-15055.

**Пример 5: Анализ размера комплексов *in vitro*, образованных между мини-ловушками VEGF (REGN10105 и REGN11095) и рекомбинантным человеческим VEGF<sub>165</sub> (REGN110), с помощью эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым рассеянием лазерного света (SEC-MALS)**

Определяли стехиометрию двух мини-ловушек VEGF (REGN10105 и REGN11095) для связывания с человеческим VEGF<sub>165</sub> (hVEGF<sub>165</sub>; REGN110).

Материалы и оборудование

**Таблица 5-1. Перечень приборов**

Прибор	Поставщик
Кватернарный насос (Quaternary Solvent manager) компании Waters Колоночное отделение (Column Compartment) компании Waters Система управления образцами (Sample Manager) компании Waters УФ-детектор компании Waters Колонка ACQUITY UPLC BEH®200 SEC (2,5 мкм, 4,6 мм × 300 мм) компании Waters	Waters Corporation, Milford, MA
Детектор рассеяния света microDawn Рефрактометрический детектор Optilab® UT-rEX	Wyatt Technology, Santa Barbara, CA

**Таблица 5-2. Реагенты и материалы**

Реагент	Поставщик
10X физиологический раствор, забуференный фосфатом Дульбекко	Gibco
Вода степени чистоты для HPLC	J.T. Baker
Гидрофосфат натрия гептагидрат	J.T. Baker
Дигидрофосфат натрия моногидрат	J.T. Baker
Перхлорат натрия	Sigma Aldrich

## Способы

**Буфер подвижной фазы SEC-MALS.** Буфер подвижной фазы (10 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 7,0 ± 0,1) готовили путем объединения 1,4 г дигидрофосфата натрия моногидрата, 10,7 г гидрофосфата натрия гептагидрата и 500 мл 5 М хлорида натрия; затем раствор доводили до объема 5,0 л с помощью воды со степенью очистки для HPLC. Конечное измеренное значение pH буфера составило 7,0. Буфер подвижной фазы перед использованием фильтровали (0,2 мкм).

**SEC-MALS.** Система SEC-MALS состояла из UPLC, соединенного с детекторами ультрафиолетового излучения (UV), светорассеяния (LS) и показателя преломления (RI). Детекторы были соединены последовательно в следующем порядке: UV-LS-RI. Детекторы LS и RI были откалиброваны в соответствии с инструкциями, предоставленными компанией Wyatt Technology. Эксклюзионную колонку VEN®200 SEC присоединяли к системе SEC-MALS и предварительно уравнивали в 10 мМ фосфате натрия, 500 мМ хлориде натрия, pH 7,0 (буфер для подвижной фазы SEC) со скоростью потока 0,3 мл/мин перед вводом проб. Каждое из определенных количеств мини-ловушек объединяли с hVEGF<sub>165</sub> (REGN110) и разбавляли 1X DPBS, pH 7,4, для получения различных соотношений. Все образцы инкубировали при температуре окружающей среды в течение 2 часов и хранили нефилтрованными при 4°C перед инъекцией. Бычий сывороточный альбумин (BSA; 2 мг/мл; загрузка образца 10 мкг) вводили отдельно и включали в качестве контроля пригодности системы.

**Анализ данных MALS.** Данные анализировали с использованием программного обеспечения ASTRA V (версия 7.3.1.9, Wyatt Technology). Данные были преобразованы таким образом, чтобы удовлетворять уравнению, которое связывает избыток рассеянного света с концентрацией растворенного вещества и среднемассовой молекулярной массой,  $M_w$ , (Kendrick *et al.*, Online Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography Light Scattering and Differential Refractometry Methods to Determine Degree of Polymer Conjugation to Proteins and Protein-Protein or Protein-Ligand Association States". (2001). Anal Biochem. 299(2), 136- 46; Wyatt (1993) Anal. Chim. Acta 272(1), 1-40, Light Scattering and the Absolute Characterization of Macromolecules):

$$\text{Уравнение 1: } \frac{K * c}{R(\theta, c)} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2 c$$

где  $c$  обозначает концентрация растворенного вещества,  $R(\theta, c)$  обозначает отношение Релея избытка растворенного вещества в зависимости от угла рассеяния и концентрации,  $M_w$  обозначает молекулярную массу,  $P(\theta)$  описывает угловую зависимость рассеянного света ( $\sim 1$  для частиц с радиусом инерции  $< 50$  нм),  $A_2$  обозначает второй вириальный коэффициент в расширении осмотического давления (которым можно пренебречь, так как измерения проводятся на разбавленных растворах) и

$$\text{Уравнение 2: } K^* = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2$$

где  $n_0$  представляет показатель преломления растворителя,  $N_A$  обозначает число Авогадро,  $\lambda_0$  обозначает длину волны падающего света в вакууме, и  $dn/dc$  представляет удельный прирост показателя преломления растворенного вещества.

Молекулярная масса мономера BSA служила для оценки констант калибровки детектора светорассеяния и дифференциального детектора показателя преломления во время сбора данных (проверка пригодности системы). Относительное стандартное отклонение (%RSD) средней молекулярной массы BSA, определенное с помощью детекторов UV и RI, составило  $\leq 5,0\%$ .

Коэффициенты нормализации для детекторов светорассеяния, объем задержки между детекторами и условия расширения полосы рассчитывали из хроматограмм BSA, собранных для использованных условий SEC-MALS. Эти значения были применены к файлам данных, собранным для всех других образцов, чтобы скорректировать эти условия.

Величину  $dn/dc$  и коэффициент экстинкции при 280 нм (с поправкой на гликозилирование) определяли экспериментально с использованием анализа белковых конъюгатов, предоставленного в программном обеспечении Astra software. Скорректированный коэффициент экстинкции и значение  $dn/dc$  использовали для анализа всех образцов белок-белкового комплекса.

### Результаты

Стехиометрию двух отдельных мини-ловушек (REGN10105 и REGN11095), связывающихся с человеческим VEGF165 (hVEGF<sub>165</sub>; REGN110), определяли с помощью анализа SEC-MALS мини-ловушки в присутствии и в отсутствие различных концентраций лиганда. В эквивалентных условиях связывания стехиометрия

связывания с hVEGF<sub>165</sub> была эквивалентной для каждой тестируемой мини-ловушки. Стехиометрия полученных комплексов из всех проанализированных образцов представлена на фигуре 18 (А) и фигуре 18 (В), и представлена в обобщенном виде в таблице 5-3 и таблице 5-4.

Репрезентативные перекрывающиеся хроматограммы, соответствующие молярным соотношениям 3:1, 1:1 и 1:3 каждой мини-ловушки к hVEGF<sub>165</sub>, показаны на фигурах 18 (А) и 18 (В). Хроматограммы свободного hVEGF<sub>165</sub> и свободной мини-ловушки также перекрываются для сравнения. Аннотированные номера пиков соответствуют свободному hVEGF<sub>165</sub> (пик 1), свободной мини-ловушке (пик 2) и комплексам мини-ловушка-hVEGF<sub>165</sub> (пик 3). Молекулярные массы для каждого из наблюдаемых пиков накладываются на отдельные пики для каждой хроматограммы.

Измеренные молекулярные массы пика 1 и пика 2 составили приблизительно 46 кДа и 63 кДа, что соответствует свободному hVEGF<sub>165</sub> и свободной мини-ловушке, соответственно. На основании рассчитанных молекулярных масс свободного hVEGF<sub>165</sub> и свободной мини-ловушки теоретическая молекулярная масса комплекса 1:1 мини-ловушка:hVEGF<sub>165</sub> составила 109 кДа. Таким образом, пик 3 на хроматограмме, скорее всего, соответствует комплексу 1:1 мини-ловушка:hVEGF<sub>165</sub>, исходя из рассчитанной средней молекулярной массы, равной приблизительно 106 кДа (таблицы 5-3 и 5-4). Кроме того, комплексы с более высокой молекулярной массой практически не обнаруживались для любого образца при любых тестируемых условиях, что указывает на то, что каждая мини-ловушка связывается с hVEGF<sub>165</sub> без мультимеризации более высокого порядка. В совокупности, результаты показывают, что каждая мини-ловушка демонстрирует стехиометрию связывания, эквивалентную hVEGF<sub>165</sub>, при этом каждая молекула мини-ловушки способна связывать одну молекулу лиганда hVEGF<sub>165</sub>.

**Таблица 5-3. Обобщенные данные по молекулярным массам и времени удерживания комплексов hVEGF<sub>165</sub> (REGN110) с REGN10105**

hVEGF <sub>165</sub>	Молярное соотношение (мол.:мол.)	Пик 1		Пик 2		Пик 3	
		Свободный hVEGF <sub>165</sub>		Свободная мини-ловушка		[Мини-ловушка] <sub>1</sub> : [hVEGF <sub>165</sub> ] <sub>1</sub> Комплекс	
		R <sub>t</sub> , мин	M <sub>w</sub> , кДа	R <sub>t</sub> , мин	M <sub>w</sub> , кДа	R <sub>t</sub> , мин	M <sub>w</sub> , кДа
hVEGF <sub>165</sub>	-	2,4	45,7	ND	ND	ND	ND
REGN10105	-	ND	ND	2,2	63,1	ND	ND

hVEGF <sub>165</sub>	Молярное соотношение (мол.:мол.)	Пик 1		Пик 2		Пик 3	
		Свободный hVEGF <sub>165</sub>		Свободная мини-ловушка		[Мини-ловушка] <sub>1</sub> : [hVEGF <sub>165</sub> ] <sub>1</sub> Комплекс	
		R <sub>t</sub> , мин	M <sub>w</sub> , кДа	R <sub>t</sub> , мин	M <sub>w</sub> , кДа	R <sub>t</sub> , мин	M <sub>w</sub> , кДа
REGN10105:hVEGF <sub>165</sub>	3:1	ND	ND	2,2	62,7	2,1	104,1
REGN10105:hVEGF <sub>165</sub>	1:1	ND	ND	ND	ND	2,1	104,4
REGN10105:hVEGF <sub>165</sub>	1:3	2,5	45,5	ND	ND	2,1	106,2

**Таблица 5-4. Обобщенные данные по молекулярным массам и времени удерживания комплексов hVEGF<sub>165</sub> (REGN110) с REGN11095**

Образец	Молярное соотношение (мол.:мол.)	Пик 1		Пик 2		Пик 3	
		Свободная hVEGF <sub>165</sub>		Свободная мини-ловушка		[Мини-ловушка] <sub>1</sub> : [hVEGF <sub>165</sub> ] <sub>1</sub> Комплекс	
		R <sub>t</sub> , мин	M <sub>w</sub> , кДа	R <sub>t</sub> , мин	M <sub>w</sub> , кДа	R <sub>t</sub> , мин	M <sub>w</sub> , кДа
hVEGF <sub>165</sub>	-	2,4	45,7	ND	ND	ND	ND
REGN11095	-	ND	ND	2,2	63,4	ND	ND
REGN11095:hVEGF <sub>165</sub>	3:1	ND	ND	2,2	65,8	2,1	106,4
REGN11095:hVEGF <sub>165</sub>	1:1	ND	ND	ND	ND	2,1	106,2
REGN11095:hVEGF <sub>165</sub>	1:3	2,5	45,8	ND	ND	2,1	106,6

R<sub>t</sub>: время удерживания; M<sub>w</sub>: среднемассовая молекулярная масса; NA: не применимо; мин:минуты; кДа: килодальтон;

**Пример 6: Структурный анализ методом криогенной электронной микроскопии (Cryo-EM) мини-ловушки VEGF REGN10105 в комплексе с VEGF и анти-VEGF Fab (REGN18)**

Криогенную электронную микроскопию использовали для анализа связывания REGN10105 с VEGF вместе с молекулой Fab. REGN18 представляет собой моноклональное антитело против VEGFR1-d2 человека, которое не блокирует связывание VEGF и было добавлено для увеличения размера комплекса, чтобы сделать образец более подходящим для исследования Cryo-EM.

**Получение фрагмента Fab.** Антитело REGN18 против домена 2 hVEGFR1 расщепляли на фрагменты F(ab')<sub>2</sub> и Fc с использованием фермента Fabricator (Genovis) в соответствии со стандартными протоколами производителя. F(ab')<sub>2</sub> восстанавливали до Fab с использованием 2-меркаптоэтиламина (2-МЕА, ThermoFisher) с последующим удалением фрагмента Fc с использованием смолы для аффинной хроматографии CaptureSelect IgG-Fc (ms) (ThermoFisher). Фрагменты Fab дополнительно очищали путем введения в колонку для эксклюзионной хроматографии (SEC) (Superdex 200 Increase 15/300 GL, GE healthcare), соединенную с хроматографической системой АКТА Avant 25 (GE Healthcare). Рабочий буфер содержал 50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 150 мМ NaCl. Пиковые фракции объединяли и концентрировали на центробежном фильтре с отсечкой 10 кДа (Millipore Sigma) для последующего использования при получении комплекса.

**Получение комплекса.** 100 мкг очищенной мини-ловушки (REGN10105-L3) смешивали с 200 мкг REGN18 Fab и 160 мкг hVEGF (REGN110-L9) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Смесь вводили в колонку SEC (Superdex 200 Increase 15/300 GL, GE), соединенную с хроматографической системой АКТА (GE Healthcare) и детектором многоугольного светорассеяния (MALS) (Wyatt Technology). Рабочий буфер SEC содержал 50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 150 мМ NaCl. Фракции пика, соответствующего комплексу REGN10105 – REGN110 – REGN18 Fab с расчетной молекулярной массой 210 кДа, объединяли и концентрировали на центробежном фильтре с отсечкой 30 кДа (Millipore Sigma) до концентрации 3,2 мг/мл, измеренной с помощью прибора Nanodrop (ThermoFisher). См. фигуру 19 (A). REGN18 не блокирует связывание VEGF и был добавлен для увеличения размера комплекса REGN10105-REGN110, чтобы сделать образец более подходящим для последующего исследования методом Cryo-EM.

**Подготовка образцов для Cryo-EM и сбор данных.** Свежеочищенный комплекс REGN10105 – REGN110 – REGN18 Fab смешивали с 0,15% детергентом PMAL-C8 Amphipol перед пипетированием 3,5 мкл смеси на сетку UltrAufoil R1,2/1,3, 300 меш (Quantifoil). Избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой, и сетку погружали в замороженный жидкий этан, охлаждаемый жидким азотом, с использованием Vitrobot Mark IV (ThermoFisher), работающего при 4°C и 100% влажности. Затем сетку загружали в микроскоп Titan Krios G3i (ThermoFisher), оснащенный камерой K3 (Gatan). Было собрано 13248 фильмов в счетном режиме при номинальном увеличении

105000x (размер пикселя 0,85 Å). Каждый фильм содержал 46 фракций дозы за 2-секундную экспозицию, а общая полученная доза на Å<sup>2</sup> составляла ~40 электронов.

**Обработка данных, полученных методом Cryo-EM и создание карты.**

Данные Cryo-EM обрабатывали с помощью Cryosparc v2.14.2. Фильмы были скорректированы по движению с помощью коррекции движения Patch, и параметры CTF были оценены с помощью оценки Patch CTF. Первоначально частицы были выбраны с помощью Blob picker для создания средних значений 2D-класса для выбора шаблона. 633335 частиц остались после проведения нескольких раундов 2D-классификации для удаления ненужных частиц. После реконструкции *ab initio* и Heterogenous refinement 125447 частиц, соответствующих комплексу REGN10105 – REGN110 – REGN18 Fab, были идентифицированы и дополнительно уточнены до реконструкции с разрешением 3,4 Å с использованием Non-uniform refinement.

**Результаты.** Было определено образование комплекса между REGN10105, hVEGF и REGN18. REGN10105 образовывал комплекс 1:1 с димером hVEGF (58 кДа + 46 кДа = 104 кДа). REGN10105, димер VEGF и REGN18 Fab образуют комплекс 1:1:2 (104 кДа + 48 кДа \* 2 = 210 кДа). В образце наблюдалось некоторое загрязнение REGN18 F(ab')<sub>2</sub>. См. фигуру 19 (A).

Двумерную структуру комплекса REGN10105/VEGF/REGN18 характеризовали путем визуализации методом криогенной электронной микроскопии. 2D-классы показали признаки вторичной структуры, а некоторые из них показали явную двукратную симметрию. Плотность домена 3 VEGFR2 видна на многих изображениях, но она довольно размыта (указана стрелкой) по сравнению с остальной частью комплекса, что позволяет предположить, что этот домен является гибким. Плотность домена 3 VEGFR2 еще более размыта на дистальном конце.

Карта 3.4 Å Cryo-EM комплекса REGN10105-VEGF-REGN18 показала низкую плотность на C-терминальном конце домена 3 VEGFR2. Для домена 2 VEGFR1, VEGF и переменного домена REGN18 Fab наблюдалась очень четкая плотность; и низкая плотность для константного домена REGN18 Fab из-за гибкости этой области. Домен 3 VEGFR2 был разделен там, где можно было проследить основную цепь и некоторые боковые цепи, но плотность Cryo-EM довольно слабая на C-терминальном конце R2-d3, вероятно, из-за высокой гибкости этой области. См. фигуру 19 (B-D).

REGN10105, который образует комплекс, по существу такой, как изображен на фигуре 19 (C-D), в комплексе с человеческим VEGF<sub>165</sub> и анти-VEGF Fab при визуализации с помощью Cryo-EM, является частью настоящего изобретения.

**Пример 7: Эффект мини-ловушек REGN10105 и REGN11095 в мышинной модели индуцированной кислородом ретинопатии (OIR)**

Определяли эффекты системных и интравитреальных REGN11095 и REGN10015 на сосудистую сеть сетчатки в мышинной модели OIR.

В модели индуцированной кислородом ретинопатии (OIR) у мышей детенышей мышей Taconic C57Bl/6 помещали в гипероксическую среду (75% O<sub>2</sub>) на день (P)6 после рождения и возвращали в комнатный воздух на P11. Исследование 1 (скрининговое исследование интравитреальных (IVT) инъекций в эквимольных количествах): щенкам OIR вводили IVT человеческий (h)Fc (hFc) 0,125 мкг, афлиберцепт 0,25 мкг, REGN10105 0,125 мкг, REGN11095 0,125 мкг, соответственно на P13 и собирали на P16. Исследование 2 (Исследование зависимости IVT доза-эффект): Мышам OIR вводили IVT hFc в количестве 0,25 мкг, REGN10105 в количестве 0,025 мкг, 0,25 мкг и 2,5 мкг или афлиберцепт в количестве 0,05 мкг, 0,5 мкг и 5 мкг на P13, и собирали на P16. Исследование 3 (Исследование системного введения (IP) в эксимольных количествах): Мышам OIR внутрибрюшинно вводили hFc в дозе 5 мг/кг, афлиберцепт в дозе 10 мг/кг, REGN10105 в дозе 5 мг/кг или REGN11095 в дозе 5 мг/мл, соответственно, на P12 и собирали на P16. Сетчатку фиксировали, вырезали и окрашивали FITC-меченым лектином I *Griffonia simplicifolia* (GS Lectin I) для мечения сосудистой сети сетчатки (Vector Laboratories), и NG2 (Millipore) с помощью вторичного Alexa Fluor594 (Thermo Scientific) для мечения неоваскулярных пучков.

Детенышей мышей помещали в камеру с 75% O<sub>2</sub> в постнатальном периоде (P)6-P11. Через 5 дней в кислородной камере их снова помещали обратно в комнатный воздух (21% O<sub>2</sub>). Для исследований интравитреального (IVT) введения мышам вводили реагенты на P13, а глаза собирали на P16. Для исследований системного (IP) введения мышам вводили реагенты на P12, а глаза собирали на P16.

*Исследование 1: Исследования интравитреального (IVT) введения афлиберцепта и мини-ловушки VEGF в эквимольных дозах*

- Афлиберцепт (REGN3): 0,25 мкг/глаз;
- REGN11095: 0,125 мкг/глаз;
- REGN10105: 0,125 мкг/глаз;
- Носитель (hFc): 0,125 мкг/глаз;

3 мыши на группу; вводят в левый и правый глаз.

В мышинной модели индуцированной кислородом ретинопатии (OIR) детенышей мышей Taconic C57Bl/6 помещали в гипероксическую среду (75% O<sub>2</sub>) на постнатальный день (P)6 и возвращали в комнатный воздух на P11.

Исследование 1 (Скрининговое исследование IVT в эквимолярных дозах): детенышам мышей OIR вводили IVT человеческий Fc (hFc) 0,125 мкг, афлиберцепт 0,25 мкг, REGN10105 0,125 мкг, REGN11095 0,125 мкг, соответственно, на P13, и собирали на P16.

Сетчатку фиксировали, вырезали и окрашивали FITC-меченым лектином I *Griffonia simplicifolia* (GS Lectin I) для мечения сосудистой сети сетчатки (Vector Laboratories), и NG2 (Millipore) вторичным Alexa Fluor594 (Thermo Scientific) для мечения неоваскулярных пучков. Бессосудистая область сетчатки мышей представлена на фигуре 20 (A). Аномальные области сетчатки мыши представлены на фигуре 20 (B).

*Исследование 2: Исследование зависимости доза-эффект при интравитреальном (IVT) введении афлиберцепта и мини-ловушки VEGF в эквимолярных дозах*

- Афлиберцепт (REGN3): 0,05 мкг/глаз, 0,5 мкг/глаз и 5 мкг/глаз;
- REGN10105: 0,025 мкг/глаз, 0,25 мкг/глаз и 2,5 мкг/глаз;
- Носитель (hFc): 0,25 мкг/глаз;

3-4 мыши в группе; инъецированы только левые глаза.

В мышинной модели индуцированной кислородом ретинопатии (OIR) детенышей мышей Taconic C57Bl/6 помещали в гипероксическую среду (75% O<sub>2</sub>) на постнатальный день (P)6 и возвращали в комнатный воздух на P11.

Исследование 2 (Исследование доза IVT-эффект): мышам OIR вводили IVT hFc в дозе 0,25 мкг, REGN10105 в дозе 0,025 мкг, 0,25 мкг и 2,5 мкг или афлиберцепт в дозе 0,05 мкг, 0,5 мкг и 5 мкг на P13, и собрали на P16.

Сетчатку фиксировали, вырезали и окрашивали FITC-меченым лектином I *Griffonia simplicifolia* (GS Lectin I) для мечения сосудистой сети сетчатки (Vector Laboratories), и NG2 (Millipore) вторичным Alexa Fluor594 (Thermo Scientific) для мечения неоваскулярных пучков.

Площадь аномальной области сетчатки, нормализованная по отношению к площади у мышей, которым вводили только hFc, представлена на фигуре 21.

*Исследование 3: Исследования системного введения афлиберцепта и мини-ловушки VEGF в эквимолярных дозах*

- Афлиберцепт (REGN3): 10 мг/кг;

- REGN10105 5 мг/кг;
- REGN11095 5 мг/кг;
- Носитель (hFc): 5 мг/кг

\* Эксперимент проводили 2 раза

3 мыши на группу; анализируются левый и правый глаз

В мышинной модели индуцированной кислородом ретинопатии (OIR) детенышей мышей Taconic C57Bl/6 помещали в гипероксическую среду (75% O<sub>2</sub>) на постнатальный день (P)6 и возвращали в комнатный воздух на P11.

Исследование 3 (Исследование системного (IP) введения в эквимоллярных дозах): мышам OIR внутрибрюшинно инъецировали hFc в дозе 5 мг/кг, афлиберцепт в дозе 10 мг/кг, REGN10105 в дозе 5 мг/кг или REGN11095 в дозе 5 мг/мл, соответственно, в P12 и собрали на P16.

Сетчатку фиксировали, вырезали и окрашивали FITC-меченым лектином I *Griffonia simplicifolia* (GS Lectin I) для мечения сосудистой сети сетчатки (Vector Laboratories), и NG2 (Millipore) вторичным Alexa Fluor594 (Thermo Scientific) для мечения неоваскулярных пучков.

Бессосудистая область сетчатки мышей, нормализованная по отношению к таковой у мышей, дозированных только hFc, представлена на фигуре 22 (A). Аномальная область сетчатки мышей, нормализованная по отношению к таковой у мышей, дозированных только hFc, представлена на фигуре 22 (B).

**Пример 8: Фармакокинетическое (PK) исследование *in vivo* ловушки и мини-ловушки VEGF (REGN10105, REGN11095 и REGN3) у кроликов**

Исследовали фармакокинетику REGN10105 и REGN11095 у кроликов.

Это фармакокинетическое исследование показало, что периоды полужизни мини-ловушек VEGF (REGN10105 и REGN11095) были короче, чем у ловушки VEGF (REGN3) в стекловидном теле кроликов NZW, персистенция мини-ловушек VEGF была на около 22% и на 32% короче, соответственно (5,0 дней против 3,9 и 3,4 дней).

**Таблица 8-1. Протестированные ловушки VEGF и мини-ловушки VEGF**

REGN#	Общепринятое название	Аминокислотная последовательность шарнира IgG
REGN3	Ловушка VEGF hIgG1 Fc	DKTHT CPPCP APELLGGPSV (SEQ ID NO: 107)

REGN10105	Мини-ловушка VEGF hIgG2 Fc с 2 cys	VE CPPCP APPVA (SEQ ID NO: 5)
REGN11095	Мини-ловушка VEGF hIgG1 мутация GGGL (SEQ ID NO: 94)	DKTHT CPPCP GGGLLG (SEQ ID NO: 13)

*Экспериментальные методики.* Ловушка VEGF (REGN3) и две новые мини-ловушки VEGF (REGN10105 и REGN11095) представляли собой молекулы, меченные Alexa Fluor 488 (AF488) посредством конъюгации с амином. Концентрации белка, уровни эндотоксина и степень мечения (DOL) представлены в таблице 8-2. Двусторонние интравитреальные (IVT) инъекции были сделаны 6 самцам новозеландских белых (NZW) кроликов (6 глаз/3 кролика/молекула). Все глаза исследовали на исходную флуоресценцию стекловидного тела с помощью флуорофотометра OcuMetrics Fluorotron fluorophotometer (Mountain View, CA) перед инъекцией, а затем наблюдали интенсивность флуоресценции стекловидного тела после инъекции на 3, 7, 14 и 21 день. Общее обследование глаз включало внутриглазное давление (IOP), признаки воспаления, отек роговицы и конъюнктивы, кровоизлияния, мушки в передней камере, размер и форму зрачка, катаракту и отслойку сетчатки до и через 30 минут после инъекции IVT, а также в каждый момент времени последующего наблюдения. Интенсивность флуоресценции и информация о положении были извлечены и импортированы в GraphPad Prism для графического отображения и анализа. Данные подгоняли к однокомпарментной модели первого порядка.

**Таблица 8-2. Период полураспада ( $t_{1/2}$ ) ловушки VEGF и мини-ловушки VEGF в интравитреальной фотофлуориметрии РК у кроликов**

Тестируемый препарат	Конъюгирование	Конц мг/мл	Эндотоксин (EU/мл)	DOL (Степень мечения AF488)	Объем (мкл) /глаз	$t_{1/2}$ (Std) Дни
----------------------	----------------	------------	--------------------	-----------------------------	-------------------	---------------------

REGN3 (афлиберцепт)	AF488	2,29	<5	2,38	50	5,0 (0,4)
REGN10105	AF488	2,92	<1,05	2,87	50	3,9 (0,3)
REGN11095	AF488	2,93	<1,05	2,65	50	3,4 (0,5)

**Результаты.** Фармакокинетическое исследование ловушки VEGF (REGN3) и мини-ловушек VEGF (REGN10105 и REGN11095) в стекловидном теле кроликов NZW показало, что период полураспада составил 5,0 ( $\pm 0,4$ ), 3,9 ( $\pm 0,3$ ) и 3,4 ( $\pm 0,5$ ) дней, соответственно. См. фигуру 23 (A-C). Не было значительного изменения IOP до и после инъекции IVT любой молекулы. См. фигуру 23 (D). Клинически значимых признаков при общем осмотре глаз не выявлено.

**Пример 9: Фармакокинетическое исследование мини-ловушек VEGF на яванских макаках**

Проводили фармакокинетическое исследование REGN10105 и REGN11095 у обезьян.

Концентрации свободного и связанного REGN10105 и REGN11095 измеряли в плазме яванских макак (6/пол/группа) после интравитреального введения. В этом исследовании анестезированные животные получали двусторонние интравитреальные инъекции REGN10105 или REGN11095 каждые 4 недели, всего 4 дозы по 5,5 мг/глаз/доза. Для введения каждой дозы 50 мкл/глаз использовали шприц А1-сс и иглу 30G. Образцы крови собирали после каждой из 4 доз для оценки системного воздействия лекарственного средства. Анализы, используемые для измерения концентраций свободных и связанных REGN10105 и REGN11095 в плазме, представляли собой методы твердофазного иммуноферментного анализа с нижним пределом количественного определения 0,078 мкг/мл для свободных и связанных видов каждого соединения. См. фигуру 24 (A-D).

Пиковые концентрации свободного REGN10105 в плазме были достигнуты к моменту первого отбора проб (6 часов), в то время как концентрации связанного REGN10105 в плазме были отсрочены и достигались, как правило, через 5-7 дней после введения дозы. Концентрации в плазме свободного или связанного REGN10105 были одинаковыми у самцов и самок обезьян после первой дозы, а также после каждой из последующих (всего 4 дозы) доз REGN10105, что указывает на отсутствие половых различий и системного накопления препарата после многократного введения. Животные, которым вводили REGN11095, несмотря на то, что они имели сходные с

REGN10105 фармакокинетические характеристики в плазме (*например*, время до достижения пиковых концентраций, отсутствие гендерных различий и отсутствие накопления после многократного дозирования), показали более низкие концентрации в плазме и воздействие, чем животные, которых дозировали REGN10105.

Сравнение концентраций свободного REGN10105 в плазме после однократной дозы (первая доза в исследовании многократных доз) с профилями концентрации в плазме REGN7483 и REGN3 показывает, что REGN7483 имеет более низкие концентрации в плазме (системное воздействие), за которым следует REGN10105, по сравнению с REGN3 при введении в виде интравитреальных инъекций в аналогичных дозах (5,5 мг/глаз REGN10105 или REGN7483, или 4 мг/глаз REGN3). Это указывает на то, что REGN7483 и REGN10105 имеют более низкое системное воздействие после интравитреальных инъекций в каждый глаз по сравнению с REGN3. См. фигуру 25.

**Пример 10: Анализ N-связанного гликана мини-ловушки VEGF**

В этом примере определяли гликановый профиль REGN10103 и REGN10105, в частности, уровни фукозилирования, галактозилирования, сиалирования, высокого содержания маннозы и бисектного гликирования.

N-связанные гликаны высвобождали из белка с помощью PNGase-F в 50 мМ буфере HEPES (pH 7,9), содержащем 0,1% Waters RapiGest и 4,2 мМ TCEP, при 45°C в течение 25 минут. Высвобожденные гликаны метили флуоресцентным красителем RapiFluor-MS при 45°C в течение 30 минут. Белок осаждали добавлением 25% DMF и 53% (об./об.) ацетонитрила и осаждали на дно пробирки посредством центрифугирования при 16000 g в течение 5 минут. Супернатант, содержащий меченые гликаны, собирали и анализировали на UPLC с использованием гидрофильной жидкостной хроматографии (колонка Waters BEH Amide) с постколоночной флуоресцентной детекцией. После связывания с колонкой меченые гликаны разделяли с использованием бинарного градиента подвижной фазы, состоящей из водного 50 мМ формиата аммония (pH 4,4) в качестве подвижной фазы А и ацетонитрила в качестве подвижной фазы В. Разделенные гликаны детектировали с помощью флуоресцентного детектора с длиной волны возбуждения 265 нм и длиной волны излучения 425 нм. Используя относительные проценты площади пиков N-гликанов на полученных хроматограммах, распределение N-гликанов представляли как общее процентное содержание N-гликанов (1), содержащих остаток коровой фукозы, (2), содержащих по меньшей мере один остаток сиаловой кислоты, (3), идентифицированных как манноза-

5, (4), содержащих по меньшей мере один остаток галактозы, и (5) бисектных N-гликанов.

Наложенные хроматограммы HILIC-FLR (хроматография гидрофильного взаимодействия-флуоресценция) N-связанных гликанов из REGN10103 и REGN10105 представлены на фигуре 26(A), и отдельные хроматограммы представлены на фигуре 26(B) и обобщены на таблице 10-1 в настоящем документе.

**Таблица 10-1. Обобщенные данные по количественному определению гликанов**

<b>Гликозилирование</b>	<b>REGN10103</b>	<b>REGN10105</b>
<b>% Фукозилирование</b>	43,3%	44,8%
<b>% Галактозилирование</b>	64,4%	71,6%
<b>% Сиалирование</b>	20,0%	26,5%
<b>% Высокое содержание маннозы</b>	25,2%	18,6%
<b>% Бисектные</b>	1,6%	1,9%

Отмечался повышенный уровень видов с высоким содержанием маннозы (например, Man5) в REGN10103 по сравнению с REGN10105. Относительная интенсивность галактозилирования и сиалирования была ниже в REGN10103, чем в REGN10105, возможно из-за повышенного содержания маннозы в REGN10103.

**Пример 11: Исследование вязкости и стабильности REGN10105**

В этом примере были проведены исследования стабильности (стабильности и фотостабильности в стрессовых условиях) и вязкости REGN10105.

Был разработан REGN10105 (IgG2, 2 Cys, мини-ловушка VEGF, расщепленная FabRICATOR) и было обнаружено, что он устраняет риск анти-шарнирных антител, связанных с Fc-расщепленной молекулой IgG1, REGN7483. Вязкость, термостабильность и фотостабильность REGN10105 оценивали в композиции, включающей гистидин.

Оценку вязкости проводили для REGN10105 при концентрациях в диапазоне 38-132 мг/мл. Строили график зависимости концентрации от вязкости, и результаты сравнивали с REGN7483. REGN10105 показал более низкий профиль вязкости по

сравнению с REGN7483 при эквимоллярных концентрациях (вязкость = 5,8 сП для REGN10105 (при 90 мг/мл) по сравнению с 6,9 сП для REGN7483 (при 90 мг/мл)). Вязкость около 12 сП наблюдалась при концентрации 120 мг/мл REGN10105. Вязкость увеличивалась экспоненциально при концентрациях выше 120 мг/мл.

Термическую стабильность REGN10105 оценивали при 90 мг/мл и 120 мг/мл во флаконах из боросиликатного стекла типа I при объеме заполнения 0,4 мл. Стабильность при тепловом стрессе тестировали при 37°C в течение 4 недель, и стабильность при хранении оценивали при 5°C до 3 месяцев. Полученные данные сравнивали с результатами тестирования стабильности для 90 мг/мл REGN7483<sup>F</sup>. REGN10105 показал более низкую скорость агрегации в условиях теплового стресса (3,74% HMW/неделю) по сравнению с REGN7483 (5,45% HMW/неделю) при 90 мг/мл. Стабильность при хранении для REGN10105 была сравнима с REGN7483 при аналогичных концентрациях. Кроме того, состав REGN10105 не показал какого-либо явного изменения в уровнях агрегации при перемешивании (1000 об/мин до 15 мин) и замораживании-оттаивании (2х).

Фотостабильность 10 мг/мл REGN10105 оценивали в фотокамере (камера фотостабильности Bahnson ES2000 CL-LT) после воздействия окружающей среды (10 Вт/м<sup>2</sup> в течение 0,6 ч и холодного белого света (CWL) при 8 Клux в течение 18 ч (6 Вт\*ч/м<sup>2</sup> и 144 Клux\*ч)) и 0,5 x ICH (10 Вт/м<sup>2</sup> в течение 10 ч и 8 Клux в течение 75 ч (100 Вт\*ч/м<sup>2</sup> и 600 Клux\*ч)). REGN10105 показал немного лучшую фотостабильность, чем REGN7483. В целом, REGN10105 показал более высокую термическую стабильность и более низкую вязкость по сравнению с REGN7483.

Все ссылки, приведенные в настоящем документе, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, запись в базу данных (например, последовательности в Genbank или записи в GeneID), патентная заявка или патент были конкретно и индивидуально указаны для включения посредством ссылки. Это заявление о включении посредством ссылки предусмотрено заявителями для того, чтобы иметь связь с каждой отдельной публикацией, записью в базу данных (*например*, последовательностей в Genbank или записей в GeneID), патентной заявкой или патентом, каждый из которых четко идентифицирован, даже если такая ссылка непосредственно не прикреплена к указанному заявлению о включении посредством ссылки. Включение указанных заявлений о включении посредством ссылки, если таковые имеются, в описание никоим образом не ослабляет

это общее заявление о включении посредством ссылки. Приведение ссылок в настоящем документе не подразумевает признание того, что ссылка имеет отношение к предшествующим уровням техники, и не представляет никакого допущения относительно содержания или даты этих публикаций или документов.

### Формула изобретения

1. Мини-ловушка VEGF, содержащая полипептид, характеризующийся доменной структурой:

$[(\text{VEGFR1 Ig2})-(\text{VEGFR2 Ig3})]_a$ -мультимеризующий компонент (МС),

или

$[(\text{VEGFR1 Ig2})-(\text{VEGFR2 Ig3})-(\text{VEGFR2 Ig4})]_a$ -мультимеризующий компонент (МС),

где  $a=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  или  $10$ ; и

где МС содержит, состоит или состоит в основном из шарнирной области, которая представляет собой:

- Fc-домен IgG, содержащий верхнюю шарнирную область, центральную шарнирную область и нижнюю шарнирную область, которая простирается до сайта расщепления протеазой IdeS  $_{GPSV}$  (SEQ ID NO: 96), но не включает его, или его вариант, при условии, что шарнирная область не состоит из аминокислотной последовательности  $DKTHTCPRPCRAPELLG$  (аминокислоты 6-21 из SEQ ID NO: 15),  $DKTHTCPRPCRPC$  (SEQ ID NO: 87);  $DKTHTCPRPCRPC$  (SEQ ID NO: 88) или  $DKTHTCPLCRAPELLG$  (SEQ ID NO: 89);

- шарнирную область IgG1, в которой остатки  $ELLG$  (SEQ ID NO: 90) мутированы в PVA;

- химеру шарнирная область IgG1-шарнирная область IgG2, в которой остатки IgG1  $ELLG$  (SEQ ID NO: 90) мутированы в PVA;

- шарнирную область IgG1, в которой остатки  $ELLG$  (SEQ ID NO: 90) мутированы в GGG;

- шарнирную область IgG1, в которой остатки  $APEL$  (SEQ ID NO: 91) мутированы в GGGF (SEQ ID NO: 92), GGGG (SEQ ID NO: 93) или GGGL (SEQ ID NO: 94);

- шарнир IgG1, в котором делетированы остатки APE;

- шарнирную область IgG2;

- шарнирную область IgG3;

- шарнирную область IgG4;

- шарнирную область IgG4, в которой остатки шарнира IgG4  $EFLG$  (SEQ ID NO: 95) мутированы в PVA; или

- шарнирную область IgG4, в которой остатки  $EFLG$  (SEQ ID NO: 95) мутированы в GGG.

2. Мини-ловушка VEGF по п. 1, где шарнирная область содержит, состоит или состоит в основном из аминокислотной последовательности:

- DKTHTCPRPCAPPVA (SEQ ID NO: 2 или ее вариант);
- DKTHTCPRPCAPGGG (SEQ ID NO: 3 или ее вариант);
- ERKCCVESCPRPCAPPVA (SEQ ID NO: 4 или ее вариант);
- VECPRPCAPPVA (SEQ ID NO: 5 или ее вариант);
- DTPRPCPRPCAPPELLG (аминокислоты 6-21 из SEQ ID NO: 6 или ее вариант);
- YGRPCPRPCAPREFLG (аминокислоты 4-18 из SEQ ID NO: 7 или ее вариант);
- YGRPCPRPCAPPVA (аминокислоты 4-17 из SEQ ID NO: 8 или ее вариант);
- YGRPCPRPCAPGGG (аминокислоты 4-17 из SEQ ID NO: 9 или ее вариант);
- DKTHTCPRPCAPPVA (SEQ ID NO: 10 или ее вариант);
- DKTHTCPRPCPGGGFLG (SEQ ID NO: 11 или ее вариант);
- DKTHTCPRPCPGGGGLG (SEQ ID NO: 12 или ее вариант);
- DKTHTCPRPCPGGGLLG (SEQ ID NO: 13 или ее вариант); или
- DKTHTCPRPCPLLG (SEQ ID NO: 14 или ее вариант).

3. Ловушка VEGF, содержащая полипептид, характеризующийся доменной структурой:

$[(\text{VEGFR1 Ig2})-(\text{VEGFR2 Ig3})]_a$ -мультимеризующий компонент (MC),

или

$[(\text{VEGFR1 Ig2})-(\text{VEGFR2 Ig3})-(\text{VEGFR2 Ig4})]_a$ -мультимеризующий компонент (MC),

где  $a=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  или  $10$ ; и

где MC содержит шарнирную область Fc человека, которая представляет собой:

- шарнирную область IgG1, содержащую стелс мутацию;
- химеру шарнирная область IgG1-шарнирная область IgG2;
- шарнирную область IgG1 с одним или несколькими мутированными

остатками APPELLG (SEQ ID NO: 108) или PEL;

- IgG1 с делецией остатка APE;
- шарнирную область IgG2;
- шарнирную область IgG3;
- шарнирную область IgG4; или
- шарнирную область IgG4, содержащую стелс мутацию;

где MC содержит сайт расщепления протеазой.

4. Ловушка VEGF по п. 3, где MC содержит, состоит или состоит в основном из аминокислотной последовательности:

ERKSCDKTHTCRRPCRAPELLGGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 15 или ее вариант) или ее аминокислоты 6-25;

ERKSCDKTHTCRRPCRAAPPVAGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 16 или ее вариант) или ее аминокислоты 6-24;

ERKSCDKTHTCRRPCRAPGGGGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 17 или ее вариант) или ее аминокислоты 6-24;

ERKCCVESCRRPCRAAPPVAGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 18 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-21 или 6-21;

ERKSCDTRRPCRRPCRAPELLGGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 19 или ее вариант) или ее аминокислоты 6-25;

ESKYGRRPCRRPCRAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 20 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-22;

ESKYGRRPCRRPCRAAPPVAGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 21 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-21;

ESKYGRRPCRRPCRAPGGGGPSVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO: 22 или ее вариант) или ее аминокислоты 1-21;

DKTHTCRRPCRAAPPVAGPSV (SEQ ID NO: 70);

DKTHTCRRPCPGGGFLGGPSV (аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 74);

DKTHTCRRPCPGGGGLGGPSV (аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 75);

DKTHTCRRPCPGGGLGGPSV (аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 76); или

DKTHTCRRPCRLGGPSV (аминокислоты из 6-22 SEQ ID NO: 77).

5. Ловушка VEGF по любому из пп. 3-4, где MC содержит, состоит или состоит в основном из аминокислотной последовательности:

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 23 или ее вариант);

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 24 или ее вариант);

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 25 или ее вариант);

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(SEQ ID NO: 26 или ее вариант);

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 27 или ее вариант);

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 28 или ее вариант);

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 29 или ее вариант);

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 30 или ее вариант);

или

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 31 или ее вариант).

6. Мини-ловушка VEGF, которая содержит, состоит или состоит в основном из аминокислотной последовательности:

SDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI IWDSRKGFI ISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKERKCCVECPCPAPPVA

(SEQ ID NO: 32 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEY PSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKVECP PAPPVA

(SEQ ID NO: 33 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEY PSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCP PAPPVA

(SEQ ID NO: 34 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEY PSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKESKYGP PAPPVA

(SEQ ID NO: 35 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEY PSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCP PAPPVA

(SEQ ID NO: 36 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEY PSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCP PGGGFLG

(SEQ ID NO: 37 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEY PSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCP PGGGGLG

(SEQ ID NO: 38 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEY PSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCP PGGGLL

(SEQ ID NO: 39 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEY PSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCP PCLL

(SEQ ID NO: 40 или ее вариант).

7. Ловушка VEGF, которая содержит, состоит или состоит в основном из аминокислотной последовательности:

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEY PSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKVECP PAPPVAGPSVFLFP  
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY

KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 41 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPVAGPSVF  
LFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 42 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKERKCCVECPAPPVAGPS  
VFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWL  
NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 43 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKESKYGPPCPPAPPVAGPS  
VFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSOSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(SEQ ID NO: 44 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPVAGPSVF  
LFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNG  
KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 45 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCGGGFLGGPSV  
FLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 46 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL

VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPGGGLGGPSV  
 FLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
 YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 47 или ее вариант);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPGGGLGGPSV  
 FLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
 YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 48 или ее вариант);

or

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG  
 LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPPSSKHQHKKL  
 VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPLLGGPSVFLF  
 PPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 49 или ее вариант).

8. Ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF по любому из пп. 1-7, которая является гликозилированной.

9. Ловушка или мини-ловушка VEGF по пп. 1-8, где
- указанная ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF содержит N-связанные гликаны;
  - указанная ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF содержит O-связанные гликаны;
  - указанная ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF сиалилирована, галактозилирована и/или фукозилирована по одному или нескольким остаткам;
  - указанная ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF содержит N-связанный гликан с 5 остатками маннозы (Man5) и/или бисектный N-гликан по одному или нескольким остаткам; и/или
  - указанная ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF содержит гликозилирование клеток CHO.

10. Ловушка или мини-ловушка VEGF по любому из пп. 1-9, характеризующаяся одним или несколькими из следующих признаков:

- связывается с VEGF<sub>165</sub> человека с  $K_D$  около 1-2 пМ или более высокой аффинностью при 25°C, где указанная аффинность измерена с помощью поверхностного плазмонного резонанса;
- имеет молекулярную массу менее 97 кДа;
- имеет  $IC_{50}$  около  $1-2 \times 10^{-11}$  М для блокирования VEGF<sub>121</sub> и/или VEGF<sub>165</sub> активации VEGFR1 и/или VEGFR2, как измерено в клетках HEK293, экспрессирующих внеклеточный домен рецептора VEGF, слитый с внутриклеточным доменом IL18R альфа или IL18R бета, и имеющих репортерный ген NFκappaB-люцифераза-IRES-eGFP;
- проявляет меньшую иммуногенность в образцах сыворотки обезьян, не подвергавшихся ранее лечению, и/или в образцах исходной сыворотки человека с AMD/DME по сравнению с REGN7483, как измерено с помощью анализа антител против лекарственных средств (ADA);
- образует комплекс 1:1 с гомодимером VEGF<sub>165</sub>;
- образует комплекс 1:1:2 с гомодимером VEGF<sub>165</sub> и фрагментом Fab против VEGF (мини-ловушка VEGF: гомодимер VEGF<sub>165</sub>: фрагмент Fab против VEGF);
- уменьшает неоваскуляризацию сетчатки при интравитреальном введении в мышиную модель ретинопатии, индуцированной кислородом;
- обладает более коротким интравитреальным периодом полураспада, чем афлиберцепт в глазах кроликов при интравитреальной инъекции;
- имеет период полураспада около 3,4 или 3,9 дней в стекловидном теле кролика при инъекции около 0,146 мг мини-ловушки VEGF;
- демонстрирует более низкие уровни свободной молекулы в плазме при интравитреальной инъекции в дозе около 5,5 мг/глаз, чем при интравитреальной инъекции афлиберцепта в дозе 4 мг/глаз у примата, отличного от человека;
- демонстрирует концентрацию около 0,1, или 0,2, или 0,1-0,2 мкг/мл (или менее) свободной молекулы в плазме примата, отличного от человека, примерно через 336 часов после интравитреальной инъекции около 5,5 мг/глаз;
- не накапливается значительно в глазах примата, отличного от человека, после четырех интравитреальных инъекций примерно каждые 28 дней в дозе около 5,5 мг/глаз;
- демонстрирует меньшее образование высокомолекулярных соединений, чем афлиберцепт и/или REGN7483, при хранении при 37°C в течение 4 недель;

- имеет вязкость около 5,8 сП при концентрации 90 мг/мл и/или около 12,1 сП при концентрации 120 мг/мл при 20°C;
- образует HMW соединения при воздействии света с увеличением примерно на 8,8% HMW/M люкс\*ч (по сравнению с контролем в темноте);
- один или несколько гистидинов окисляются до 2-оксогистидина;
- один или несколько триптофанов раскисляются;
- один или несколько аспарагинов гликозилированы;
- один или несколько серинов или треонинов O-гликозилированы;
- один или несколько аспарагинов дезамидированы;
- один или несколько мотивов аспартат-глицин превращаются в изо-аспартат-глицин и/или Asn-Gly;
- один или несколько метионинов окислены;
- один или несколько триптофанов превращаются в N-формилкинуренин;
- один или несколько аргининов превращаются в Arg 3-дезоксиглюкозон;
- C-концевой остаток отсутствует;
- имеется один или несколько негликозилированных сайтов гликозилирования;
- является ксилозилированной;
- гликирована по лизину;
- содержит цистин со свободной тиольной группой;
- содержит внутрицепочечный дисульфидный мостик;
- содержит дисульфидные мостики в параллельной или перекрестной ориентации; и/или
- содержит лизин или аргинин, который карбоксиметилирован.

11. Ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF по любому из пп. 1-10, которая представляет собой гомодимер.

12. Композиция, содержащая гетерогенную смесь гликозилированных вариантов ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF по любому из пп. 1-11.

13. Композиция по п. 12, где около 20-27% ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF сиалилированы, около 64-72% ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF галактозилированы, около 43-45% ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF

фукозилированы, около 19-25% ловушек VEGF или мини-ловушек VEGF Man-5 гликозилированы и/или около 1-2% модифицированы бисектным N-гликаном.

14. Композиция, содержащая мини-ловушку VEGF и ловушку VEGF по любому из пп. 1-11; необязательно, дополнительно содержащая протеазу IdeS или ее вариант.

15. Комплекс, содержащий гомодимер ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF по любому из пп. 1-11, связанный с VEGF или его гомодимером.

16. Комплекс по п. 15:

- где VEGF представляет собой человеческий VEGF;
- где VEGF представляет собой человеческий VEGF<sub>165</sub>;
- где VEGF представляет собой человеческий VEGF<sub>121</sub>;
- который включает антитело против VEGF или его фрагмент Fab;
- который включает гомодимер VEGF человека и фрагмент Fab против

VEGF, где стехиометрическое соотношение гомодимер мини-ловушки VEGF : VEGF человека: Fab составляет 1:1:2; и/или

- где стехиометрическое соотношение гомодимер мини-ловушки VEGF : гомодимер VEGF составляет 1:1.

17. Фармацевтический состав, содержащий ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF по любому из пп. 1-11 и фармацевтически эффективный носитель.

18. Выделенный полинуклеотид, кодирующий ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF по любому из пп. 1-9, необязательно содержащий нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 71, 72 или 73.

19. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 18.

20. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или вектор по любому из пп. 18-19.

21. Клетка-хозяин по п. 20, которая представляет собой клетку яичника китайского хомячка.

22. Выделенный полипептид, содержащий, состоящий или состоящий в основном из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 32-49.

23. Способ изготовления мини-ловушки VEGF или ее фармацевтического состава, включающий контактирование ловушки VEGF по любому из пп. 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 или 11 с протеазой, которая расщепляет MC указанной ловушки VEGF, и инкубацию ловушки VEGF и протеазы в условиях, способствующих расщеплению, и необязательно выделение мини-ловушки VEGF, являющейся продуктом расщепления.

24. Способ по п. 23, где протеазой является IdeS.

25. Способ по п. 24, где протеаза IdeS содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID No: 50-65.

26. Способ изготовления ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, включающий инкубацию клетки-хозяина по любому из пп. 20-21 в культуральной среде в условиях, способствующих экспрессии ловушки или мини-ловушки, и необязательно выделение ловушки или мини-ловушки из клетки-хозяина и/или среды.

27. Способ по п. 26, где ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF представляет собой ловушку VEGF, дополнительно включающий контактирование ловушки VEGF с протеазой, которая расщепляет MC указанной ловушки VEGF, и инкубацию ловушки VEGF и протеазы в условиях, способствующих расщеплению протеазой.

28. Ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF, которая является продуктом способа по любому из пп. 23-27.

29. Ловушка VEGF или мини-ловушка VEGF по п. 28, которая представляет собой гомодимер.

30. Композиция, которая является продуктом способа по любому из пп. 23-25 или 27, которая содержит ловушку VEGF, протеазу IdeS и мини-ловушку VEGF, которая является продуктом расщепления указанной ловушки VEGF указанной протеазой.

31. Сосуд, биореактор или инъекционное устройство, содержащее ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF, или их фармацевтический состав по любому из пп. 1-11 или 17, или 28, или 29.

32. Сосуд, биореактор или инъекционное устройство по п. 31, которое представляет собой инъекционное устройство, выбранное из шприца, одноразового шприца и предварительно заполненного шприца.

33. Инъекционное устройство по любому из пп. 31-32, которое является стерильным и/или стеклянным, и/или пластиковым.

34. Способ лечения или предупреждения ангиогенного заболевания глаз у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, или их фармацевтического состава по любому из пп. 1-11, или 17, или 28, или 29 субъекту.

35. Способ по п. 34, где ангиогенное заболевание глаз представляет собой возрастную дегенерацию желтого пятна, влажную возрастную дегенерацию желтого пятна, отек желтого пятна, отек желтого пятна после окклюзии вены сетчатки, окклюзию вены сетчатки (RVO), окклюзию центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзию ветвей вены сетчатки (BRVO), диабетический макулярный отек (DME), хориоидальную неоваскуляризацию (CNV), неоваскуляризацию радужки, неоваскулярную глаукому, ретинопатию недоношенных (ROP), послеоперационный фиброз при глаукоме, пролиферативную витреоретинопатию (PVR), неоваскуляризацию диска зрительного нерва, неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию сетчатки, неоваскуляризацию стекловидного тела, паннус, птеригиум, сосудистую ретинопатию, диабетическую ретинопатию у субъекта с диабетическим макулярным отеком; диабетическую ретинопатию, непролиферативную диабетическую ретинопатию и/или пролиферативную диабетическую ретинопатию.

36. Способ по любому из пп. 34-35, где ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF вводят субъекту внутриглазным способом.

37. Способ по любому из пп. 34-35, где ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF вводят субъекту интравитреально.

38. Способ уменьшения неоваскуляризации сетчатки и/или снижения проницаемости сосудов сетчатки, и/или увеличения аваскуляризированной области сетчатки, и/или уменьшения васкуляризированной области сетчатки у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, или их фармацевтического состава по любому из пп. 1-11 или 17, или 28, или 29.

39. Способ лечения или предупреждения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, или их фармацевтического состава по любому из пп. 1-11 или 17, или 28, или 29.

40. Способ по п. 39, где рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, колоректальный рак, метастатический колоректальный рак, рак предстательной железы, рак кожи или рак желудка.

41. Способ введения субъекту ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, или их фармацевтического состава по любому из пп. 1-11 или 17, или 28, или 29, включающий введение ловушки VEGF или мини-ловушки VEGF, или фармацевтического состава в организм субъекта.

42. Способ по п. 41, где ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF, или фармацевтический состав вводят в организм субъекта путем инъекции.

43. Способ по любому из пп. 41-42, где ловушку VEGF или мини-ловушку VEGF, или фармацевтический состав вводят в глаз субъекта путем интравитреальной инъекции.

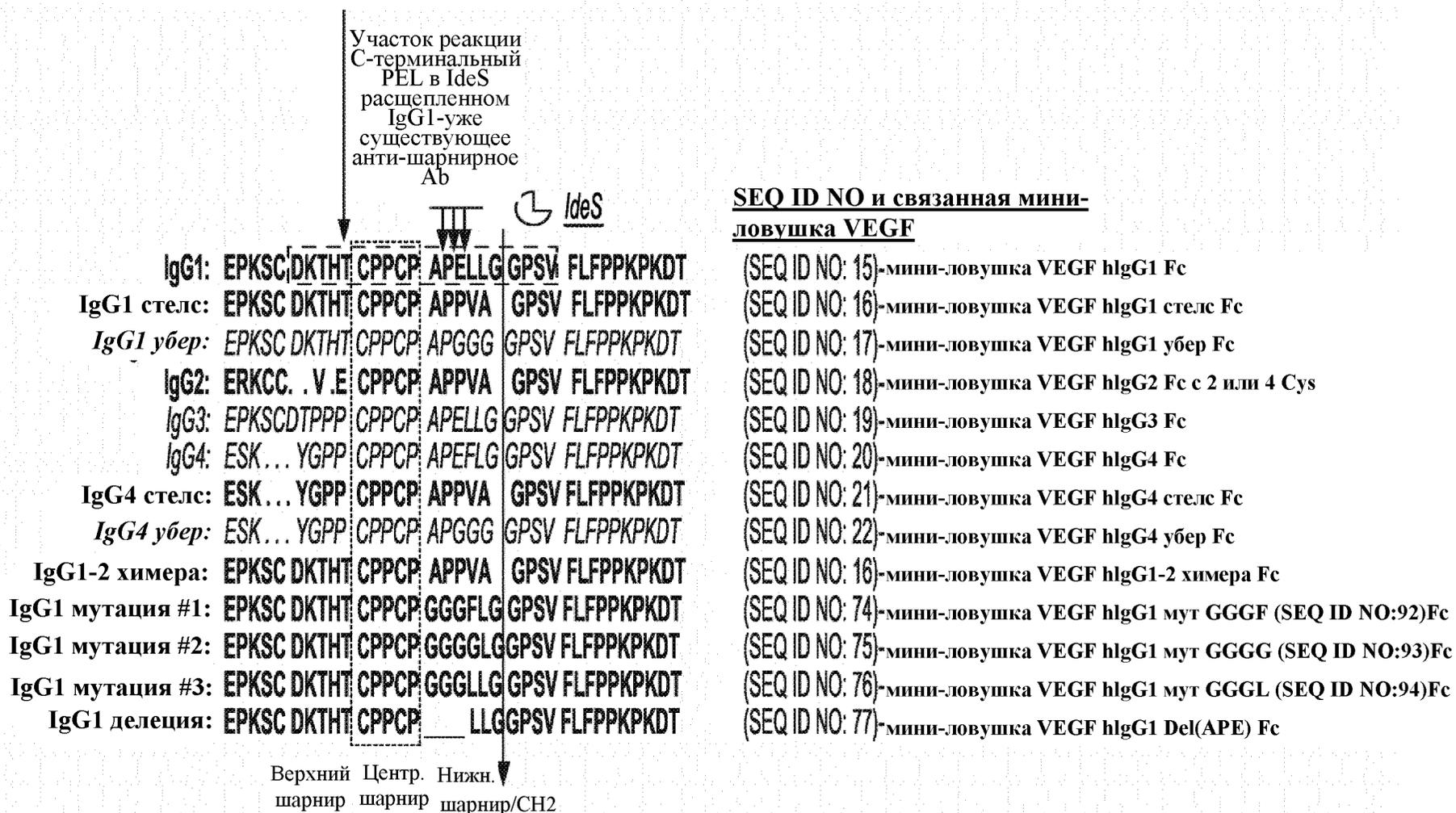
44. Способ по любому из пп. 34-38 или 41-43, где у субъекта отсутствует повышение внутриглазного давления и/или артериального давления после указанного введения.

Фигура 1

Ловушка VEGF	Мини-ловушка VEGF в результате расщепления IdeS	IgGs	Аминокислотная последовательность шарнира IgG [// сайт расщепления IdeS]
REGN3	REGN7483	hlgG1	DKTHTCPPCPAPELLG // GPSV аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 15)
REGN10104	REGN10104	hlgG1 стелс	DKTHTCPPCPAPPVA // GPSV (SEQ ID NO: 70)
REGN10102	REGN10105	hlgG2 с 2Cys	VECPCCAPPVA // GPSV аминокислоты 6-21 из SEQ ID NO: 18)
REGN10117	REGN10103	hlgG2 с 4Cys	ERKCCVECPCCAPPVA // GPSV аминокислоты 1-21 из SEQ ID NO: 18)
REGN10187	REGN10187	hlgG4 стелс	YGPPCCAPPVA // GPSV аминокислоты 4-21 из SEQ ID NO: 21)
REGN10511		hlgG1-2 химера	DKTHTCPPCPAPPVA // GPSV (SEQ ID NO: 70)
REGN10512		hlgG1 мут GGGF (SEQ ID NO: 92)	DKTHTCPPCGGGFLG // GPSV аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 74)
REGN10513		hlgG1 мут GGGG (SEQ ID NO: 93)	DKTHTCPPCGGGGLG // GPSV аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 75)
REGN10514		hlgG1 мут GGGL (SEQ ID NO: 94)	DKTHTCPPCGGGLLG // GPSV аминокислоты 6-25 из SEQ ID NO: 76)
REGN10515		hlgG1 del (APE)	DKTHTCPPCPLLG // GPSV аминокислоты 6-22 из SEQ ID NO: 77)

Фигура 2

Участок реакции С-терминальный Т в IgG1 Fab-уже существующее анти-шарнирное Ab



**SEQ ID NO и связанная мини-ловушка VEGF**

Фигура 3

Ловушка Мини-ловушка	Изотип	Общепринятое название	Описательное название конструкции	MW (кДа)
REGN3	Человеческий IgG1	Ловушка VEGF hlgG1 Fc [Афлиберцепт]	Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain 3(V226-K327).hlgG1_Fc_v2(D104-K330)	97.18
REGN7483		Расщепленная Ides мини-ловушка VEGF hlgG1 Fc	Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain 3(V226-K327).hFc DKHTHTCPPCPPELLG(D104-G119) ("DKHTHTCPPCPPELLG" disclosed as SEQ ID NO: 1)	49.44
REGN10104	Человеческий IgG1 стелс	Ловушка VEGF hlgG1 стелс Fc	Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain 3(V226-K327).hlgG1_CH1 v1(D104-T108).hlgG2_Hinge(C106-A115).hlgG4_CH2(G117-G221).hlgG1_CH3(Q225-K330)	96.82
REGN10104		Расщепленная Ides мини-ловушка VEGF hlgG1 стелс Fc	Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain 3(V226-K327).hlgG1 DKHTHTCPPCPAPPVA ("DKHTHTCPPCPAPPVA" disclosed as SEQ ID NO: 2)	
REGN10102	Человеческий IgG2 с 2 Cys	Ловушка VEGF hlgG2 Fc с 2 cys	Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain 3(V226-K327).hlgG2*01 SapI(human)	96.24

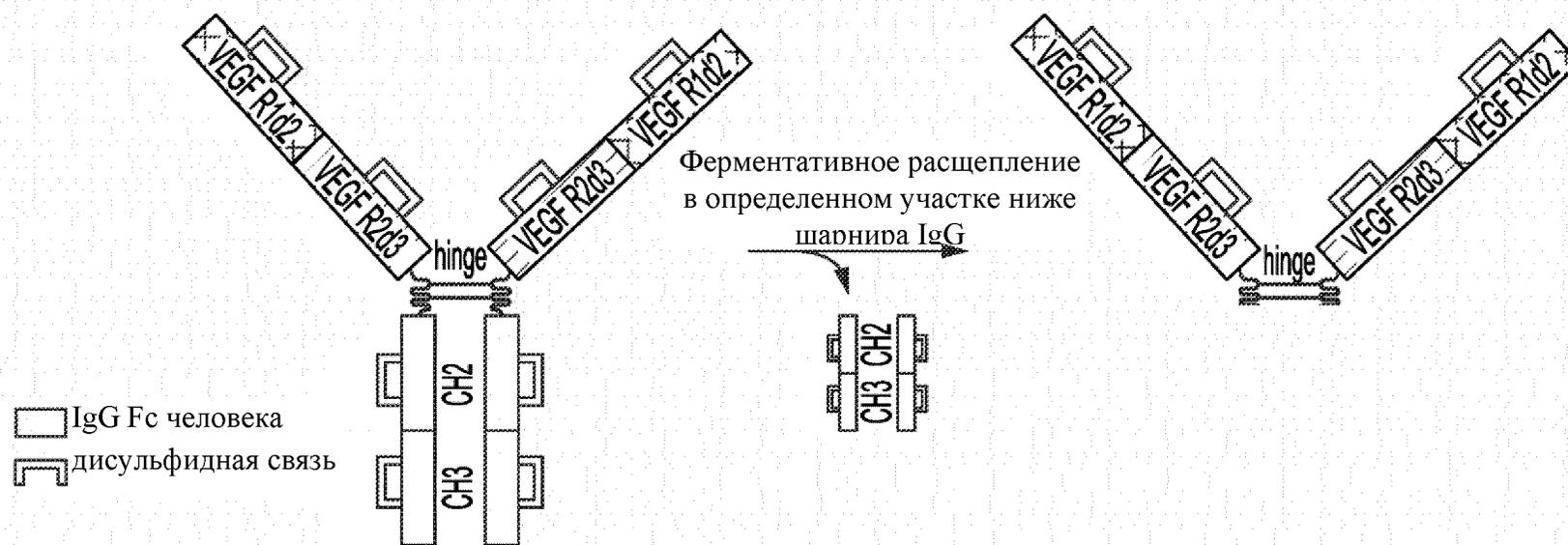
Фигура 3 продолжение

<b>REGN10105</b>		<b>Расщепленная Ides мини-ловушка VEGF hlgG2 Fc с 2 cys</b>	Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain 3(V226-K327).hlgG2_Fc w_2 cys CPPCPAPPVA(V104-A115) ("CPPCPAPPVA" disclosed as SEQ ID NO: 109)	48.44
<b>REGN10105</b>		<b>Рекомбинантная мини-ловушка VEGF hlgG2 Fc с 2 cys</b>		
<b>REGN10117</b>	Человеческий IgG2 с 4 Cys	<b>Ловушка VEGF hlgG2 Fc с 4 cys</b>	Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain 3(V226-K327).hlgG2_Fc w_4 cys(E99-K326;S257A)	97.48
<b>REGN10103</b>		<b>Расщепленная Ides мини-ловушка VEGF hlgG2 Fc с 4 cys</b>	Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain 3(V226-K327).hlgG2_Fc w_4 cys CPPCPAPPVA(E99-A115) ("CPPCPAPPVA" disclosed as SEQ ID NO: 109)	49.68
<b>REGN10103</b>		<b>Рекомбинантная мини-ловушка VEGF hlgG2 Fc с 4 cys</b>		
<b>REGN10187</b>	Человеческий IgG4 стелс	<b>Ловушка VEGF hlgG4 стелс Fc</b>	Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain 3(V226-K327).hlgG4 (E99-P105)(E99-P105).hlgG2_Hinge(C106-A115).hlgG4_CH2-CH3(G117-K327)	97.26
<b>REGN10187</b>		<b>Расщепленная Ides мини-ловушка VEGF hlgG4 стелс Fc</b>	Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain 3(V226-K327).hlgG4 YGPPCPPCPAPPVA ("YGPPCPPCPAPPVA" disclosed as SEQ ID NO: 115)	
<b>REGN10511</b>	<b>IgG1-2 химера</b>	<b>Ловушка VEGF hlgG1-2 химера Fc</b>	Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain 3(V226-K327).hlgG1 hinge(D102-P113)(D104-	96.96

Фигура 3 продолжение

			P113).hlgG2Fc (A111-K326)(A111-K326;S257A)	
<b>REGN10512</b>	<b>hlgG1</b> мутация	<b>Ловушка VEGF hlgG1</b> мутация <b>GGGF</b> (SEQ ID NO: 92) Fc	<b>Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain</b> <b>3(V226-K327).hlgG1 hinge(D102-P113)(D104-</b> <b>P113).hlgG2Fc (A111-K326)(A111-</b> <b>K326;S257A)</b>	<b>97.0</b>
<b>REGN10513</b>	<b>hlgG1</b> мутация	<b>Ловушка VEGF hlgG1</b> мутация <b>GGGG</b> (SEQ ID NO: 93) Fc	<b>Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain</b> <b>3(V226-K327).hlgG1 hinge(D102-P113)(D104-</b> <b>P113).hlgG2Fc (A111-K326)(A111-</b> <b>K326;S257A)</b>	<b>96.82</b>
<b>REGN10514</b>	<b>hlgG1</b> мутация	<b>Ловушка VEGF hlgG1</b> мутация <b>GGGL</b> (SEQ ID NO: 94) Fc	<b>Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1 Ig Domain</b> <b>3(V226-K327).hlgG1 hinge(D102-P113)(D104-</b> <b>P113).GGLLG(human).hlgG1 Fc (G120-</b> <b>K330)(G120-K330) ("GGLLG " disclosed as</b> <b>SEQ ID NO: 110)</b>	<b>96.92</b>
<b>REGN10515</b>	<b>hlgG1</b> делеция	<b>Ловушка VEGF hlgG1</b> делеция (APE) Fc	<b>AC14047 - Flt1 Ig Domain 2(S129-D231).hFLK1</b> <b>Ig Domain 3(V226-K327).hlgG1 hinge(D102-</b> <b>P113)(D104-P113).hlgG1 Fc (L117-K330)(L117-</b> <b>K330)</b>	<b>96.58</b>

Фигура 4



Фигура 5

VEGF trap REGN3  
 VEGF mini trap REGN7483F  
 VEGF Trap hlgG1 stealth Fc  
 VEGF trap hlgG2 Fc w\_4 cys  
 VEGF mini trap hlgG2 Fc w\_4 cys  
 VEGF trap hlgG2 Fc w\_2 cys  
 VEGF mini trap hlgG2 Fc w\_2 cys

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI IWD SRKGFII SNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVLSPSHGIELSVGEKII  
 SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI IWD SRKGFII SNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVLSPSHGIELSVGEKII

VEGF trap REGN3  
 VEGF mini trap REGN7483F  
 VEGF Trap hlgG1 stealth Fc  
 VEGF trap hlgG2 Fc w\_4 cys  
 VEGF mini trap hlgG2 Fc w\_4 cys  
 VEGF trap hlgG2 Fc w\_2 cys  
 VEGF mini trap hlgG2 Fc w\_2 cys

125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240

VLNCTARTELVNVDGIDFNWEY PSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDK--THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMQ  
 VLNCTARTELVNVDGIDFNWEY PSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDK--THTCPPCPAPPELLG\*-----  
 VLNCTARTELVNVDGIDFNWEY PSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDK--THTCPPCPAPPVAG--PSVFLFPPKPKDTLMQ  
 VLNCTARTELVNVDGIDFNWEY PSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKERKCCVECPAPAPPVAG--PSVFLFPPKPKDTLMQ  
 VLNCTARTELVNVDGIDFNWEY PSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKERKCCVECPAPAPPVAG\*-----  
 VLNCTARTELVNVDGIDFNWEY PSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK-----VECPAPAPPVAG--PSVFLFPPKPKDTLMQ  
 VLNCTARTELVNVDGIDFNWEY PSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK-----VECPAPAPPVAG\*-----

trap – ловушка  
 mini trap – мини-  
 ловушка  
 w – c  
 stealth - стелс

Фигура 5 - продолжение

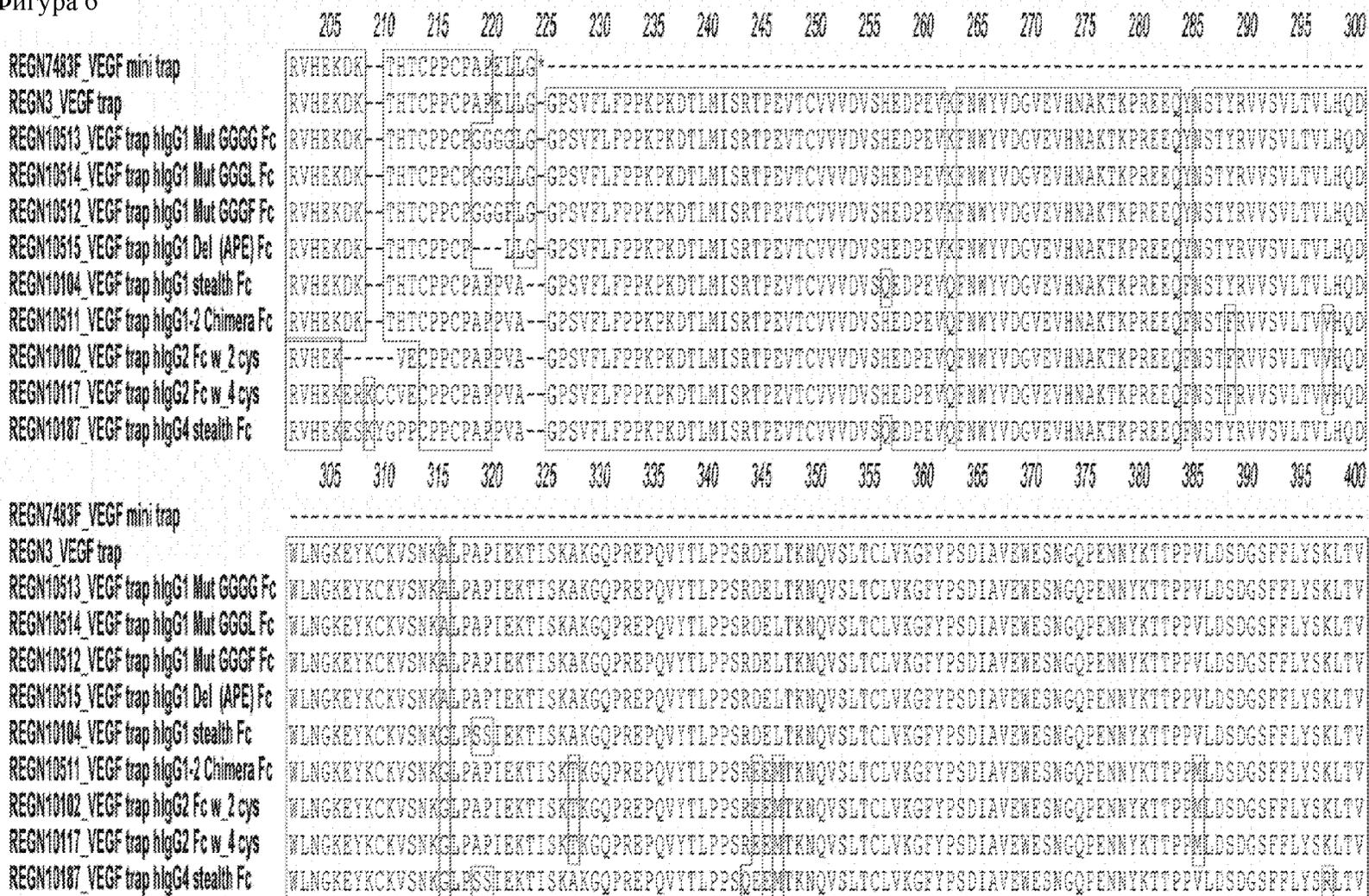
	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300	305	310	315	320	325	330	335	340	345	350	355	360
VEGF trap REGN3	SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTIRVYSVLTVAHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY																							
VEGF mini trap REGN7483F	-----																							
VEGF Trap hlgG1 stealth Fc	SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTIRVYSVLTVAHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY																							
VEGF trap hlgG2 Fc w_4 cys	SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTIRVYSVLTVAHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY																							
VEGF mini trap hlgG2 Fc w_4 cys	-----																							
VEGF trap hlgG2 Fc w_2 cys	SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTIRVYSVLTVAHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY																							
VEGF mini trap hlgG2 Fc w_2 cys	-----																							

	365	370	375	380	385	390	395	400	405	410	415	420	425	430	435	
VEGF trap REGN3	PSDIAVEWESNGQFENNYKTTPTMELDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVTFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK*															(SEQ ID NO: 69)
VEGF mini trap REGN7483F	PSDIAVEWESNGQFENNYKTTPTMELDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVTFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK*															(SEQ ID NO: 67)
VEGF Trap hlgG1 stealth Fc	PSDIAVEWESNGQFENNYKTTPTMELDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVTFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK*															(SEQ ID NO: 42)
VEGF trap hlgG2 Fc w_4 cys	PSDIAVEWESNGQFENNYKTTPTMELDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVTFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK*															(SEQ ID NO: 43)
VEGF mini trap hlgG2 Fc w_4 cys	PSDIAVEWESNGQFENNYKTTPTMELDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVTFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK*															(SEQ ID NO: 32)
VEGF trap hlgG2 Fc w_2 cys	PSDIAVEWESNGQFENNYKTTPTMELDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVTFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK*															(SEQ ID NO: 41)
VEGF mini trap hlgG2 Fc w_2 cys	PSDIAVEWESNGQFENNYKTTPTMELDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVTFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK*															(SEQ ID NO: 33)

trap – ловушка  
 mini trap – мини-  
 ловушка  
 w – c  
 stealth – стелс

trap – ловушка, mini trap – міні-ловушка, w – c, stealth – стелс, Mut – мутація, Del – делеція, Chimera – химера

Фигура 6



тар – ловушка, mini тар – мини-ловушка, w – c, stealth – стелс, Mut – мутация, Del – делеция, Chimera - химера

Фигура 6 - продолжение

	405	410	415	420	425	430	435	
REGN7483F_VEGF mini trap								
REGN3_VEGF trap								(residues 201-221 of SEQ ID NO: 67)
REGN10513_VEGF trap hlgG1 Mut GGGG Fc								(residues 201-432 of SEQ ID NO: 69)
REGN10514_VEGF trap hlgG1 Mut GGGL Fc								(residues 201-432 of SEQ ID NO: 47)
REGN10512_VEGF trap hlgG1 Mut GGGF Fc								(residues 201-432 of SEQ ID NO: 48)
REGN10515_VEGF trap hlgG1 Del (APE) Fc								(residues 201-432 of SEQ ID NO: 46)
REGN10104_VEGF trap hlgG1 stealth Fc								(residues 201-428 of SEQ ID NO: 49)
REGN10511_VEGF trap hlgG1-2 Chimera Fc								(residues 201-431 of SEQ ID NO: 42)
REGN10102_VEGF trap hlgG2 Fc w_2 cys								(residues 201-431 of SEQ ID NO: 45)
REGN10117_VEGF trap hlgG2 Fc w_4 cys								(residues 201-428 of SEQ ID NO: 41)
REGN10187_VEGF trap hlgG4 stealth Fc								(residues 201-433 of SEQ ID NO: 43)
								(residues 201-433 of SEQ ID NO: 44)

Фигура 7 (А)

#1 – Афлиберцепт и расщепленная протеазой IdeS мини-ловушка (hlgG1)

Ловушка VEGF REGN3-hlgG1Fc

SDTGRPEVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEK DKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR  
TPEVTCVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPARIKT  
ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYRS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGSEFF LYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 69)

↓ сайт расщепления  
протеазой IdeS

Мини-ловушка REGN7483 – образованная в результате расщепления  
REGN3 под действием Fabricator

SDTGRPEVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEK DKTHT CPPCPAPELL G  
(SEQ ID NO: 67)

CPPC (SEQ ID NO: 100)-центральный шарнир

VEGFR1d2 domain  
VEGFR2d3 domain  
hlgG1Fc

domain - Домен

Фигура 7 (В)

#2-Ловушка VEGF REGN10104 (hlgG1 стелс) и расщепленная протеазой IdeS мини-ловушка

Ловушка VEGF REGN10104 (hlgG1 стелс Fc)

SDTGRPEVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY : PSSKHQHKLVNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFV RVHEKOKTHT CPPCPAPPVA GRSVLEFPPK PKDTLMISRT  
PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI  
SKAKGQPRER QVYTLPPSRD ELTKNOVSLT GLVKGFYPSD IAVEWESNGO PENNYKTPP VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR  
WQQGNVFCSSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 42)

↓ сайт расщепления  
протеазой IdeS

Мини-ловушка – образованная в результате расщепления протеазой  
IdeS REGN10104 (hlgG1 стелс Fc)

SDTGRPEVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY PSSKHQHKLVNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFVRVHEKOKTHT CPPCPAPPVA

(SEQ ID NO: 34)

VEGFR1d2 domain  
VEGFR2d3 domain  
hlgG1 stealth Fc

domain - Домен

Фигура 7 (С)

#3-Ловушка VEGF REGN10102 (hlgG2 c/2cys) и расщепленная протеазой IdeS мини-ловушка REGN10105

Ловушка VEGF REGN10102 (hlgG2 Fc с 2 cys)

SDTGRPEVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY : PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFV : RVHEKVE CPP CPAPPVAGPS VLFPPKPKD TLMISRTREV  
TCVVVDVSHE DREVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRWSVLTIVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP ARIEKTISKI  
KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQREN NYKTTPRMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

(SEQ ID NO: 41)

↓ сайт расщепления  
↓ протеазой IdeS

Мини-ловушка REGN10105 – образованная в результате расщепления  
протеазой IdeS REGN10102 hlgG2 Fc с 2 cys)

SDTGRPEVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFVRVHEKVE CPPCPAPPVA

(SEQ ID NO: 33)

VEGFR1d2 domain  
-VEGFR2d3 domain  
hlgG2 Fc

domain - Домен

Фигура 7 (D)

#4-Ловушка VEGF REGN10117 (hlgG2 с/4cys) и расщепленная протеазой IdeS мини-ловушка REGN10103

Ловушка VEGF REGN10117 (hlgG2 Fc с 4 cys)

SDTGRPEVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY : PSSKHQHKLVNRDLKTQSG :  
SEMKKFLSTL : TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFV : RVHEKERKCC VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS  
RTPEVTCVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTWVHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPAIEK  
TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNOVS LTCLVKGFP SDAIWEWESN GQRENNYKTT PMLDSGGSF FLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLS PGK

(SEQ ID NO: 43)

↓ сайт расщепления  
протеазой IdeS

Мини-ловушка REGN10103 – образованная в результате расщепления  
протеазой IdeS REGN10117 (hlgG2 Fc с 4 cys)

SDTGRPEVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY PSSKHQHKLVNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFVRVHEKERKCC VECPPCPAPP VA

(SEQ ID NO: 32)

VEGFR1d2 domain  
VEGFR2d3 domain  
hlgG2 Fc

domain - домен

Фигура 7 (Е)

#5-Ловушка VEGF REGN10187 (hlgG4 стелс) и расщепленная протеазой IdeS мини-ловушка

Ловушка VEGF REGN10187 (hlgG4 стелс Fc)

SDTGRPFVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTL PDGKRIIWD S RKGEIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY : PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFV : RVHEKESKYG PPCPPCPAPP VAGPSVFLFR PKPKDTLMIS  
RTPEVTCVV DVSQEDPEVQ FNWVYDQVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK  
TISKAKGQRR EPQVYTLPPS QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQRENHYKTT PPVLDSDGSF FLYSRLTVDK  
SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL S LGK

(SEQ ID NO: 44)

↓ сайт расщепления  
протеазой IdeS

Мини-ловушка – образованная в результате расщепления протеазой  
IdeS REGN10187 (hlgG4 стелс Fc)

SDTGRPFVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTL PDGKRIIWD S RKGEIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY : PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTLTIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFV : RVHEKESKYGPP CPPCPAPP VA

(SEQ ID NO: 35)

VEGFR1d2 domain  
VEGFR2d3 domain  
hlgG4stealth Fc

domain - домен

Фигура 7 (F)

#6-Ловушка VEGF REGN10511 (hlgG1-2 химера) и расщепленная протеазой IdeS мини-ловушка

Ловушка VEGF REGN10511 (hlgG1-2 химера)

SDTGRPFVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY : PSSKHQHKKL : VNRDLKTQSG :  
SEMKKFLSTL : TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFV : RVHEKDKTHT CPPCPAPPVA GPSVFLFRPK PKDTLMISRT  
REVTCVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPRREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAIEKTI  
SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGO PENNYKTPP MLDSDGSEFL YSKLTVDKSR  
WQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 45)

↓ сайт расщепления  
протеазой IdeS

Мини-ловушка– образованная в результате расщепления протеазой  
IdeS REGN10511 (hlgG1-2 химера)

SDTGRPFVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL : VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ GLYTCAASSG : LMTKKNSTFVRVHEKDKTHT CPPCPAPPVA

(SEQ ID NO: 36)

CPPC (SEQ ID NO: 100)-центральный шарнир

VEGFR1d2 domain  
-VEGFR2d3 domain  
hlgG2 Fc

domain - Домен

Фигура 7 (G)

#7-Ловушка VEGF REGN10512 (hlgG1 мутация GGGF) и расщепленная протеазой IdeS мини-ловушка

Ловушка VEGF REGN10512 (hlgG1 мутация GGGF Fc)

SDTGRPEVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : -VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY : PSSKHQHKKI : VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : -TIDGVTRSDQ : -GLYTCAASSG : -LMTKKNSTFV -RVHEKDKTHT CPPCPGGGFL GGPSVFLFRP KPKDTLMISR  
TPEVTCWVD VSHEDPEVKF NWWVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT  
ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNOVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKKSLSLSP GK

(SEQ ID NO: 46)

↓ сайт расщепления  
протеазой IdeS

Мини-ловушка– образованная в результате расщепления протеазой  
IdeS REGN10512 (hlgG1 мутация GGGF Fc)

SDTGRPEVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : -VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY : PSSKHQHKKI : VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : -TIDGVTRSDQ : -GLYTGAASSG : -LMTKKNSTFV -RVHEK DKTHT CPPCPGGGFL G

(SEQ ID NO: 37)

CPPC (SEQ ID NO: 100)-центральный шарнир

VEGFR1d2 domain  
VEGFR2d3 domain  
hlgG1Fc

domain - домен

Фигура 7 (H)

#8-Ловушка VEGF REGN10513 (hlgG1 мутация GGGG) и расщепленная протеазой IdeS мини-ловушка

Ловушка VEGF REGN10513 (hlgG1 мутация GGGG Fc)

SDTGRPFVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : -VLNCTARTEL : -NVGIDFNWEY : PSSKHQHKKL : VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : -TIDGVTRSDQ : -GLYTCAASSG : -LMTKKNSTFV -RVHEK DKTHT CPPCPGGGGL GGPSVFLFRP KPKDTLMISR  
TPEVTCWVD VSHEDPEVKF NWWVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT  
ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSC SVMHEALHH YTQKSLSLSP GK

(SEQ ID NO: 47)

↓ сайт расщепления  
протеазой IdeS

Мини-ловушка— образованная в результате расщепления протеазой  
IdeS REGN10513 (hlgG1 мутация GGGG Fc)

SDTGRPFVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : -VLNCTARTEL : -NVGIDFNWEY : PSSKHQHKKL : VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : -TIDGVTRSDQ : -GLYTCAASSG : -LMTKKNSTFV -RVHEK DKTHT CPPCPGGGGL G

(SEQ ID NO: 38)

CPPC (SEQ ID NO: 100)-центральный шарнир

VEGFR1d2 domain  
VEGFR2d3 domain  
hlgG1Fc

domain - домен

Фигура 7 (I)

#9-Ловушка VEGF REGN10514 (hlgG1 мутация GGGL) и расщепленная протеазой IdeS мини-ловушка REGN11095

Ловушка VEGF REGN10514 (hlgG1 мутация GGGL Fc)

SDTGRPFVEM YSEIPEIHHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : -VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY PSSKHQHKKI -VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFV RVHEK DKTHT CPPCPGGGL GGPSVFLFRP KPKDTLMISR  
TPEVTCWVD VSHEDPEVKF NWWVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPEKT  
ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

(SEQ ID NO: 48)

↓ сайт расщепления  
протеазой IdeS

Мини-ловушка REGN11095 – образованная в результате расщепления  
протеазой IdeS REGN10514 (hlgG1 мутация GGGL Fc)

SDTGRPFVEM YSEIPEIHHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : -VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY PSSKHQHKKI -VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFV RVHEK DKTHT CPPCPGGGL G

(SEQ ID NO: 39)

CPPC (SEQ ID NO: 100)-центральный шарнир

VEGFR1d2.domain  
VEGFR2d3.domain  
hlgG1Fc

domain - домен

Фигура 7 (J)

#9-Ловушка VEGF REGN10515 (hlgG1 делеция APE) и расщепленная протеазой IdeS мини-ловушка

Ловушка VEGF REGN10515 (hlgG1 делеция APE Fc)

SDTGRPEVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY : PSSKHQHKKL : VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFV RVHEK DKTHT CPPCP LL GQPSVFLFRP KPKDTLMISR  
TPEVTCWVD VSHEDPEVKF NWWVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPARIKLT  
ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QRENNYKTP PVLDSGSEFF LYSKLTVDKS  
RWQGGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP GK

(SEQ ID NO: 49)

↓ сайт расщепления протеазой IdeS

Мини-ловушка– образованная в результате расщепления протеазой IdeS REGN10515 (hlgG1 делеция APE Fc)

SDTGRPEVEM YSEIPEIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE  
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDWLSPSH : : GIELSVGEKL : VLNCTARTEL : NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL : VNRDLKTQSG  
SEMKKFLSTL : TIDGVTRSDQ : GLYTCAASSG : LMTKKNSTFV RVHEK DKTHT CPPCP LLG

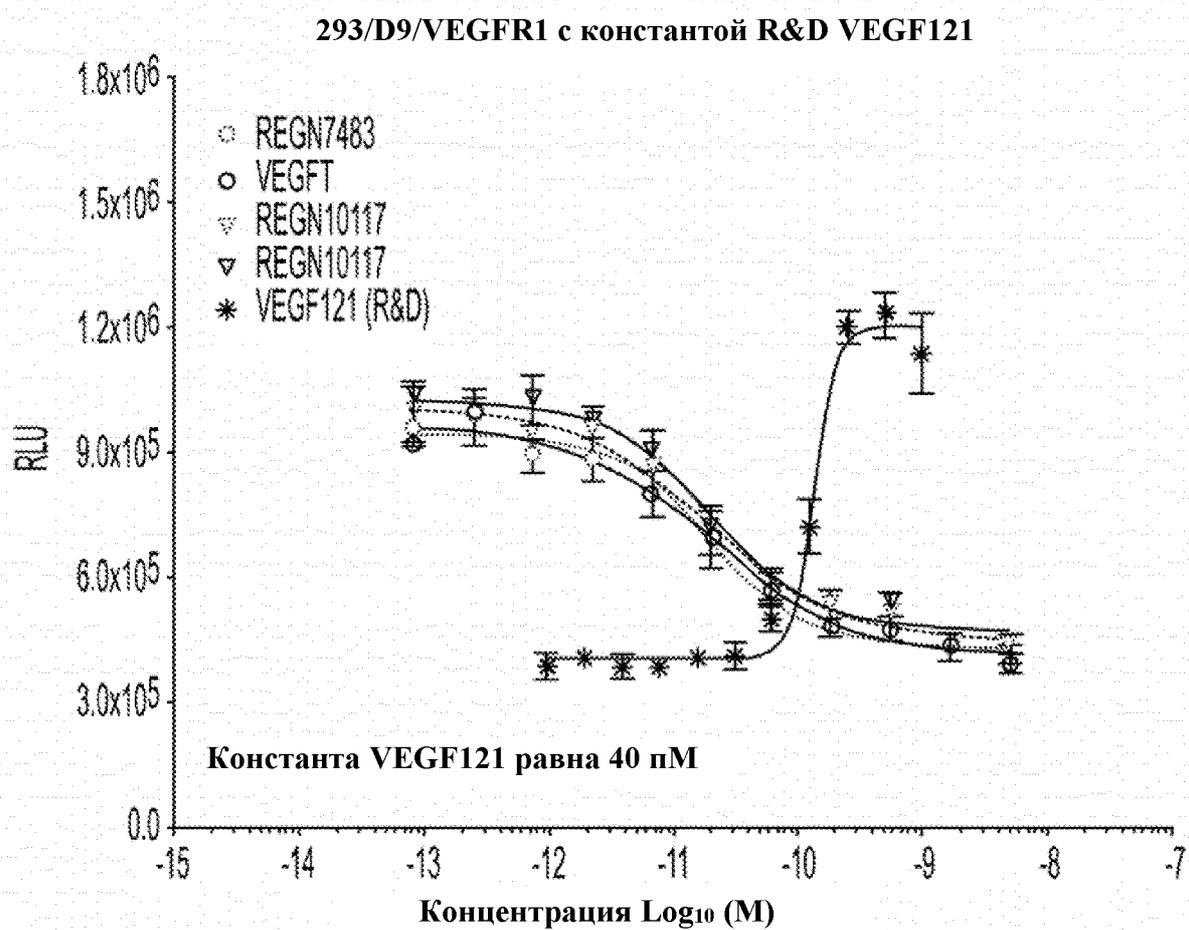
(SEQ ID NO: 40)

CPPC (SEQ ID NO: 100)-центральный шарнир

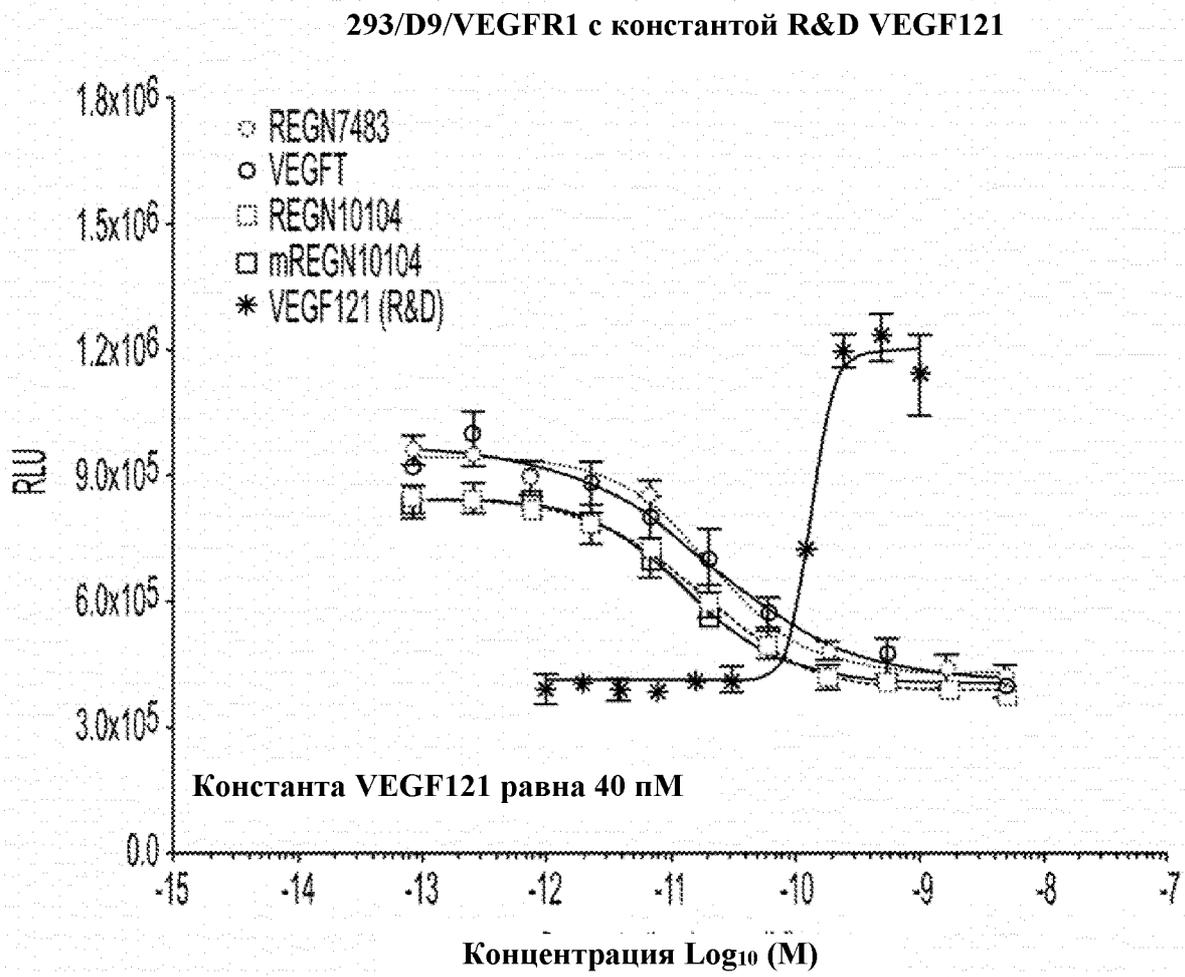
VEGFR1d2 domain  
VEGFR2d3 domain  
hlgG1Fc

domain - Домен

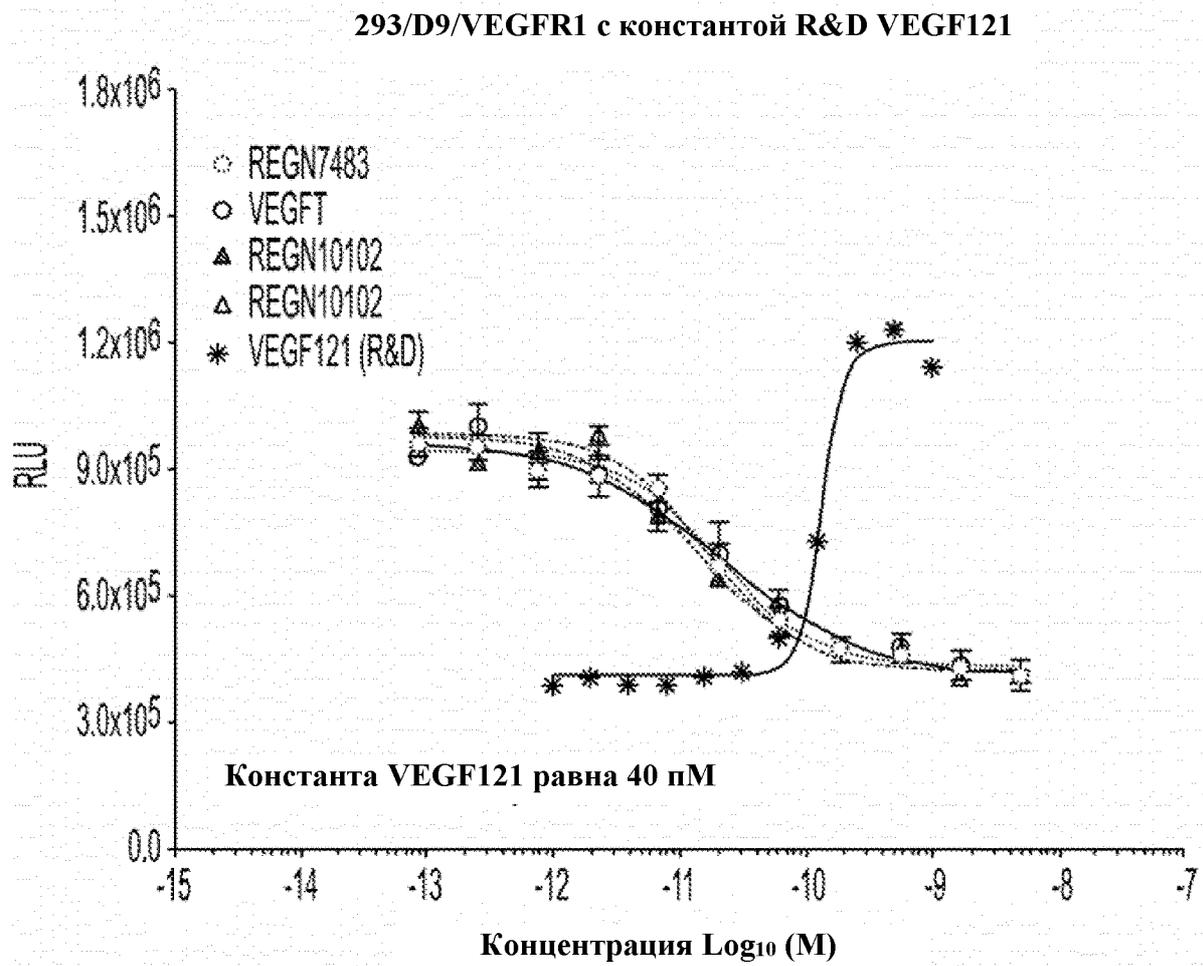
Фигура 8(A)



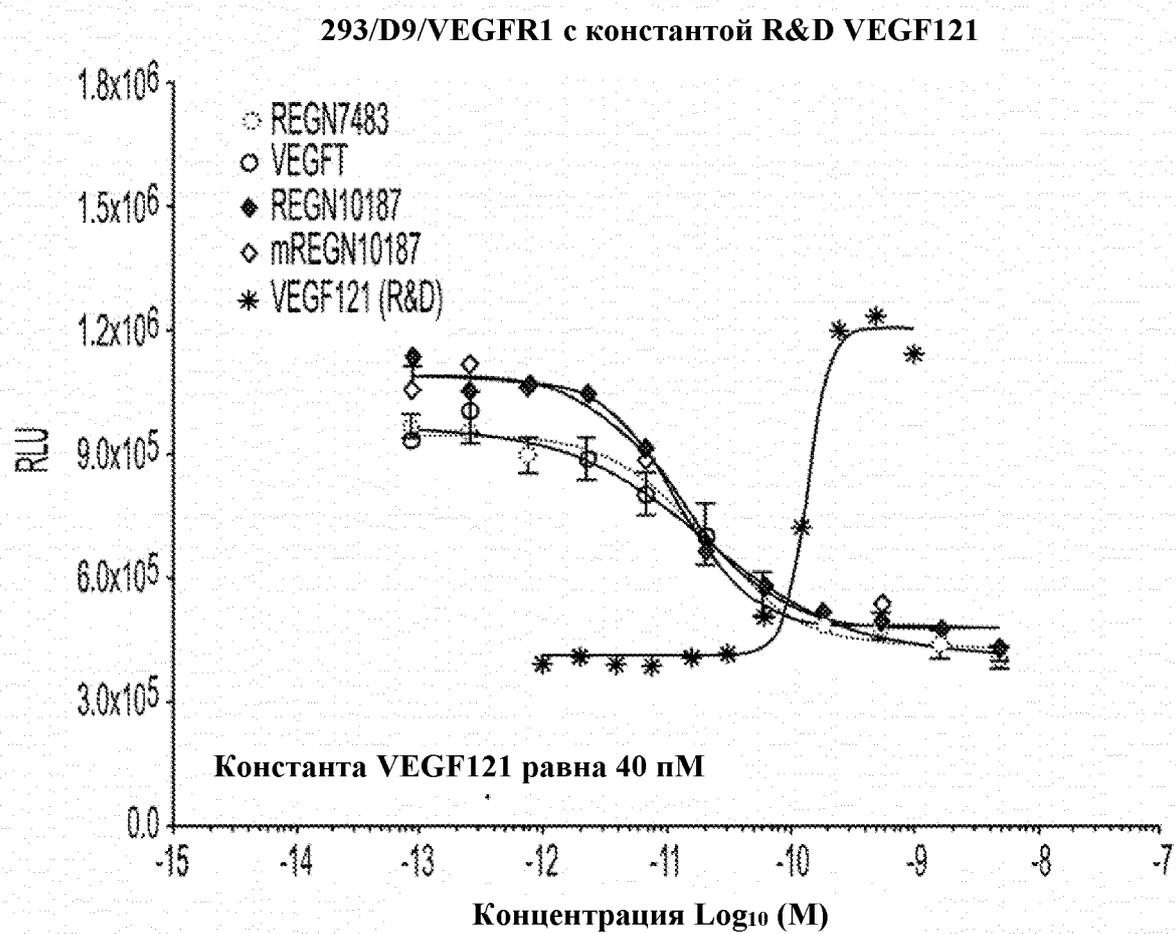
Фигура 8(В)



Фигура 8(С)

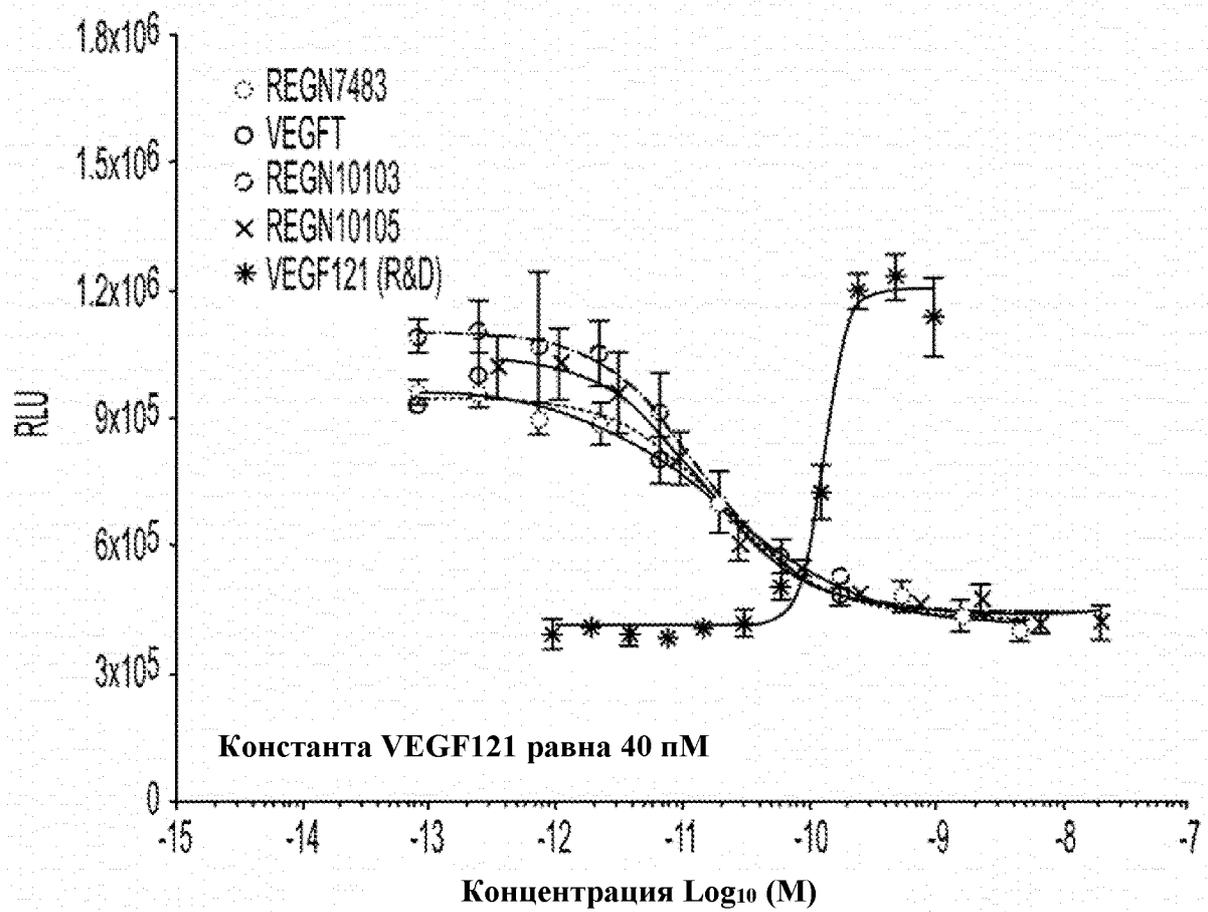


Фигура 8(D)



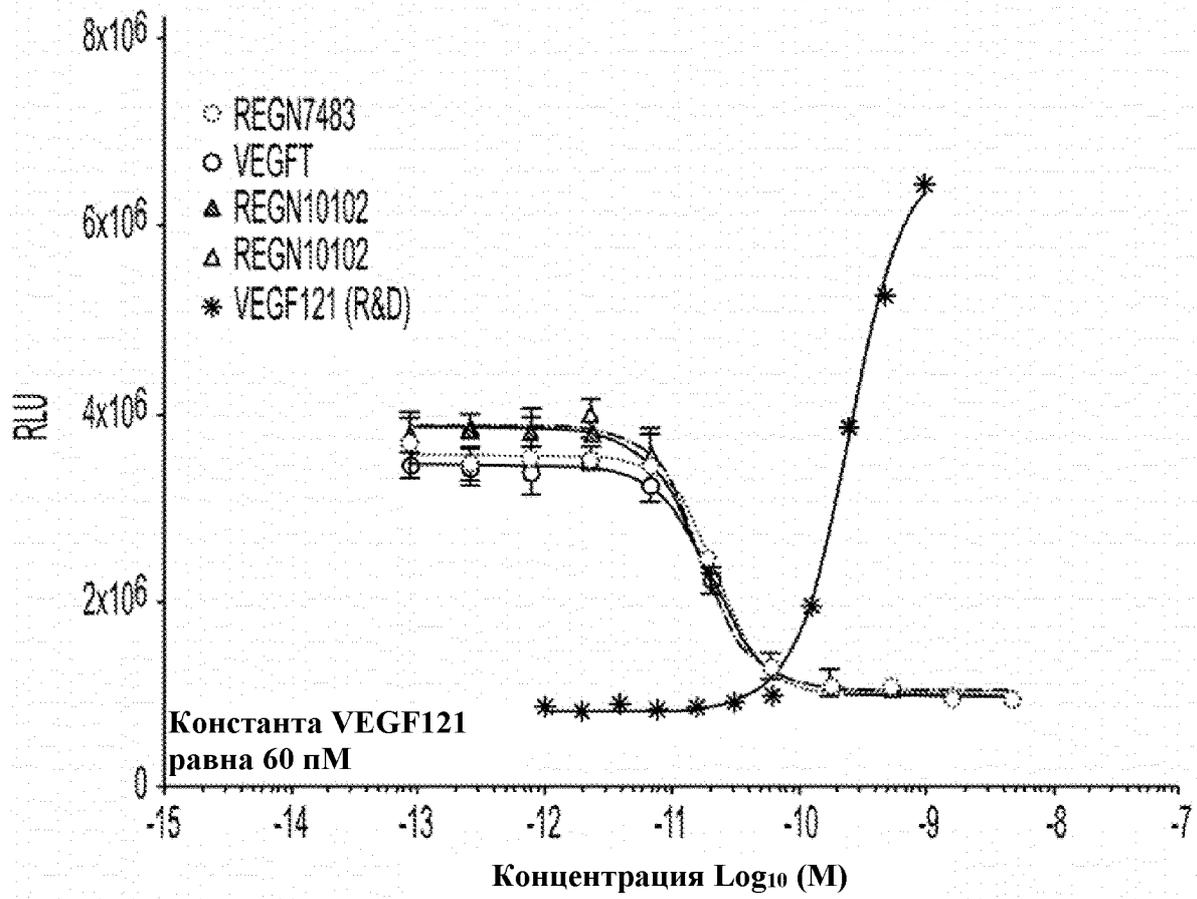
Фигура 8(Е)

## 293/D9/VEGFR1 с константой R&amp;D VEGF121



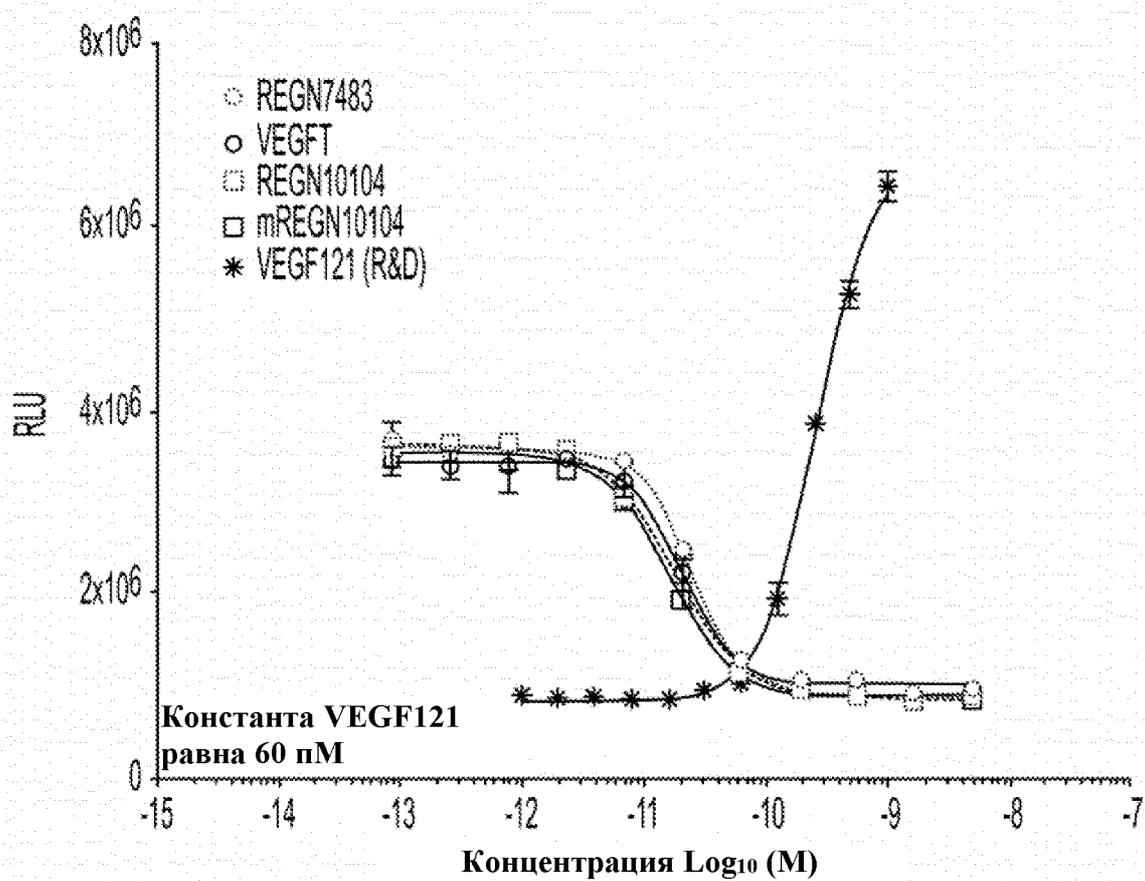
Фигура 9(A)

## 293/D9/VEGFR2 с константой R&amp;D VEGF121

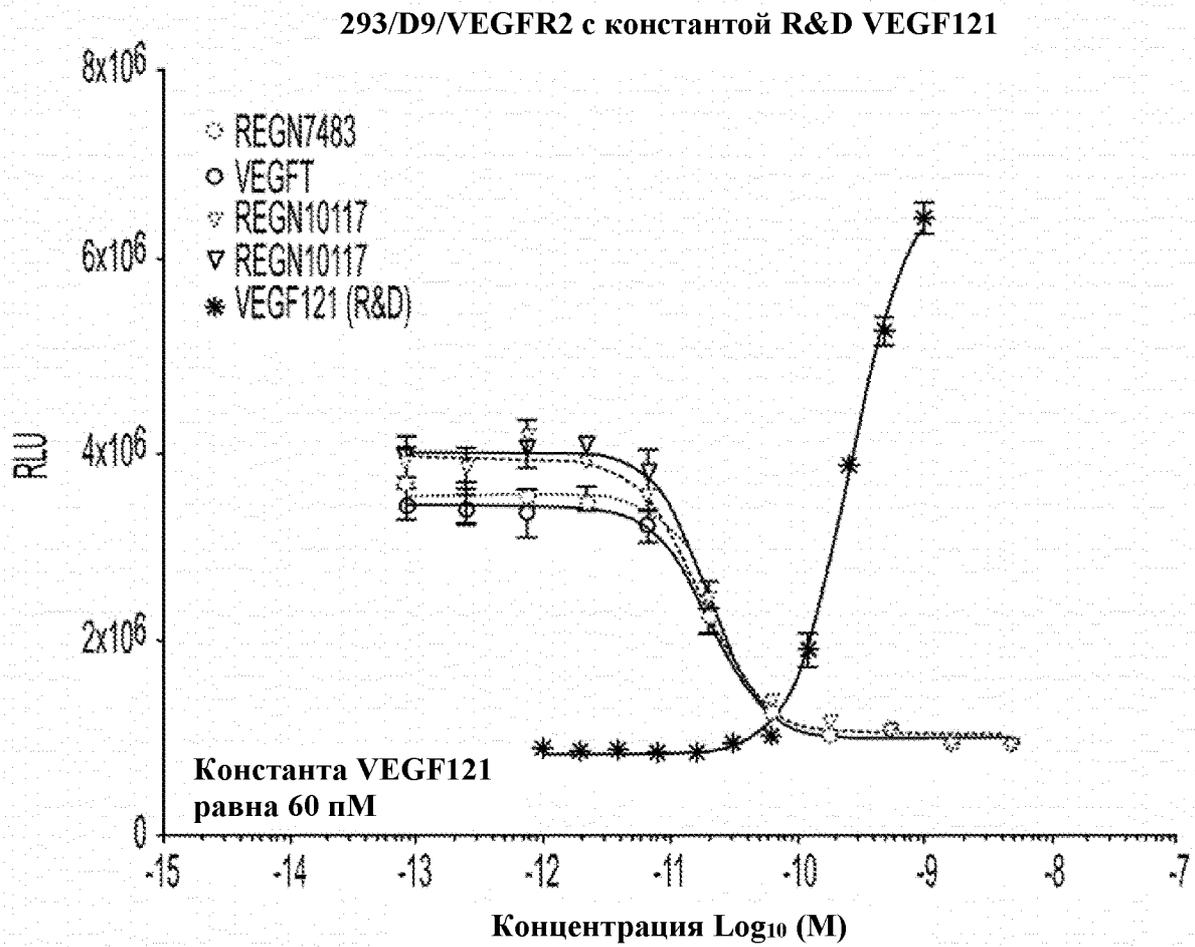


Фигура 9(B)

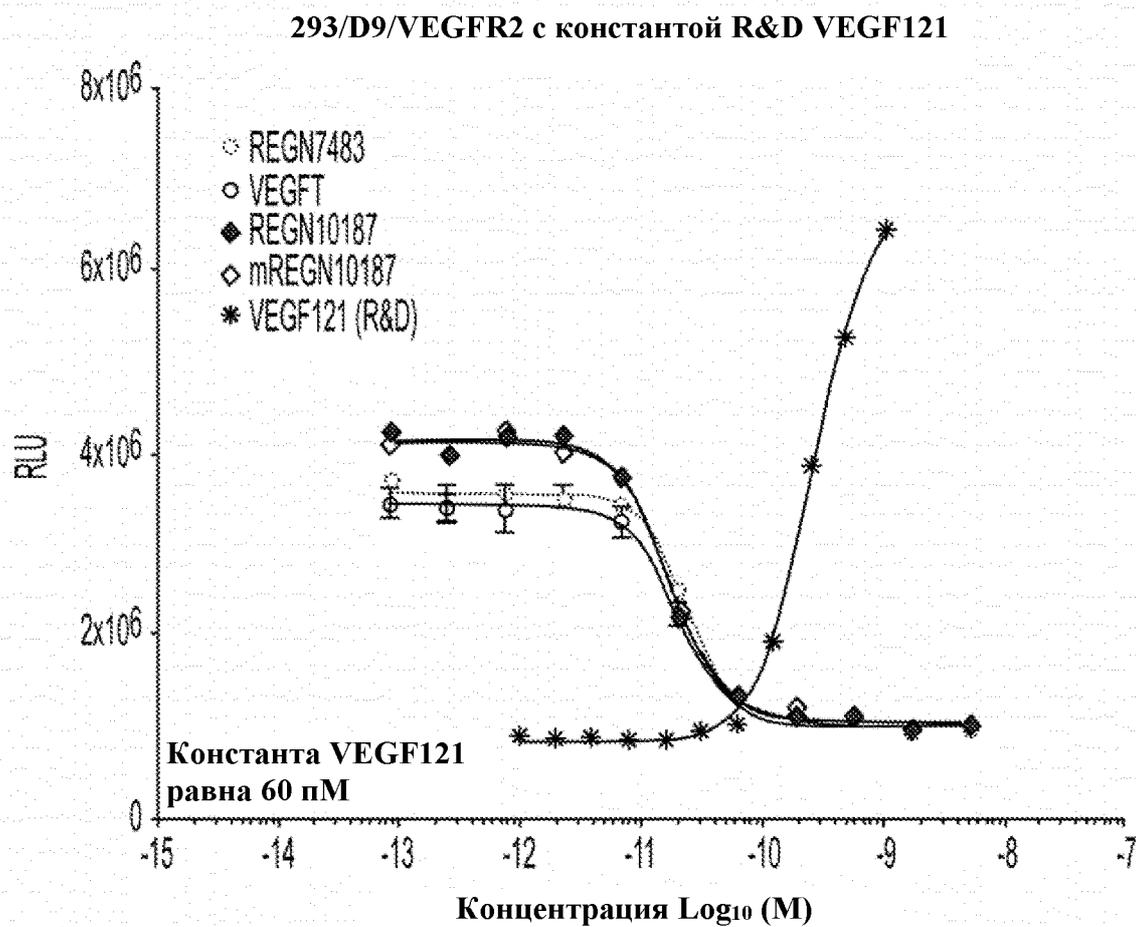
## 293/D9/VEGFR2 с константой R&amp;D VEGF121



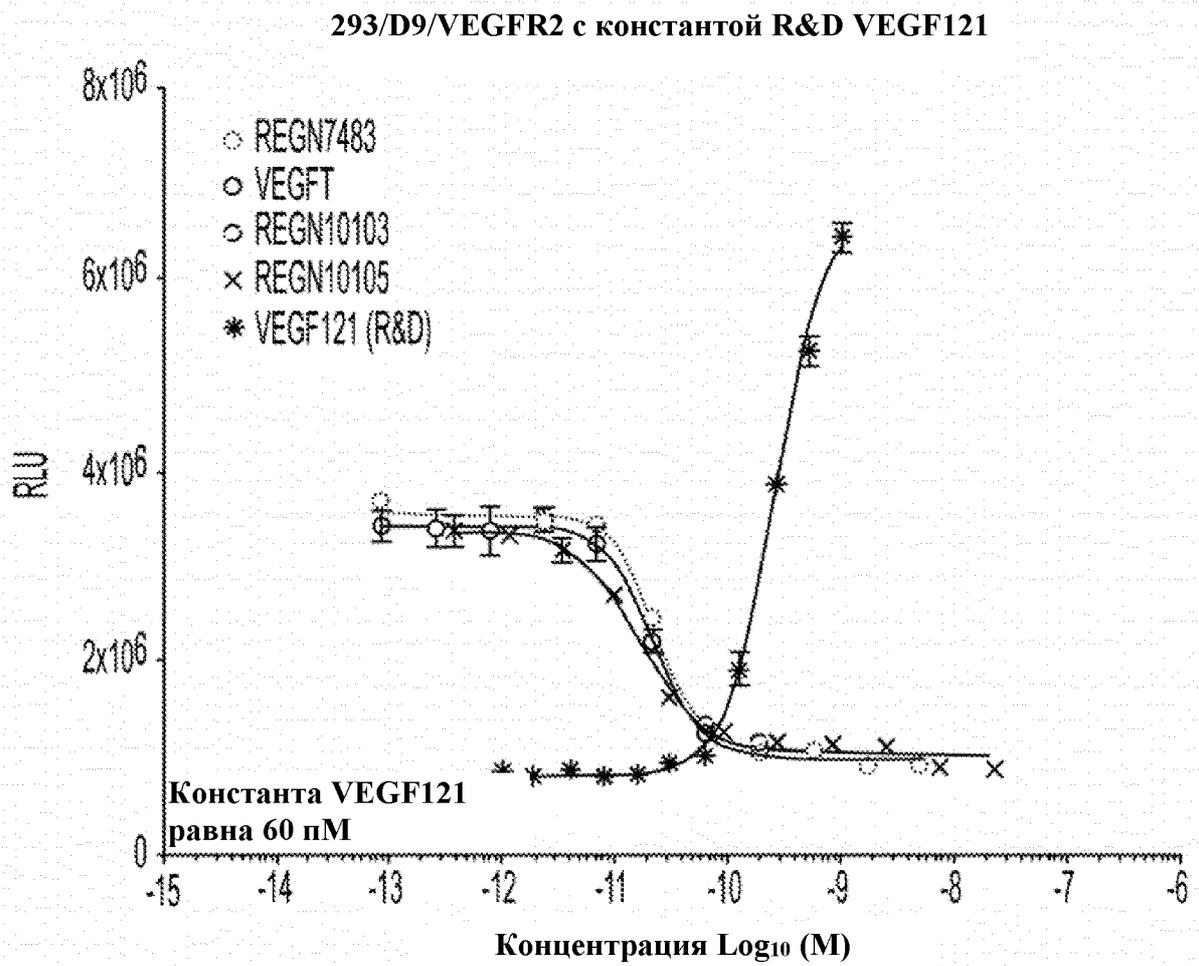
Фигура 9(С)



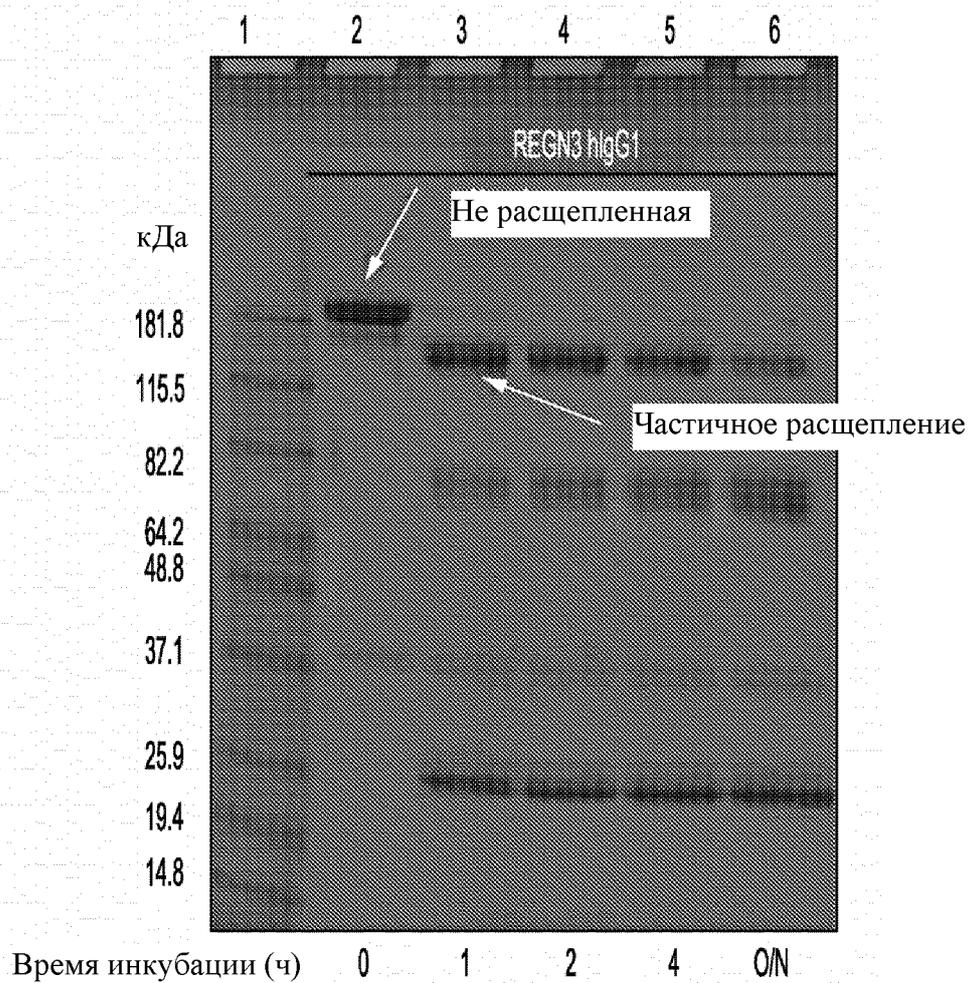
Фигура 9(D)



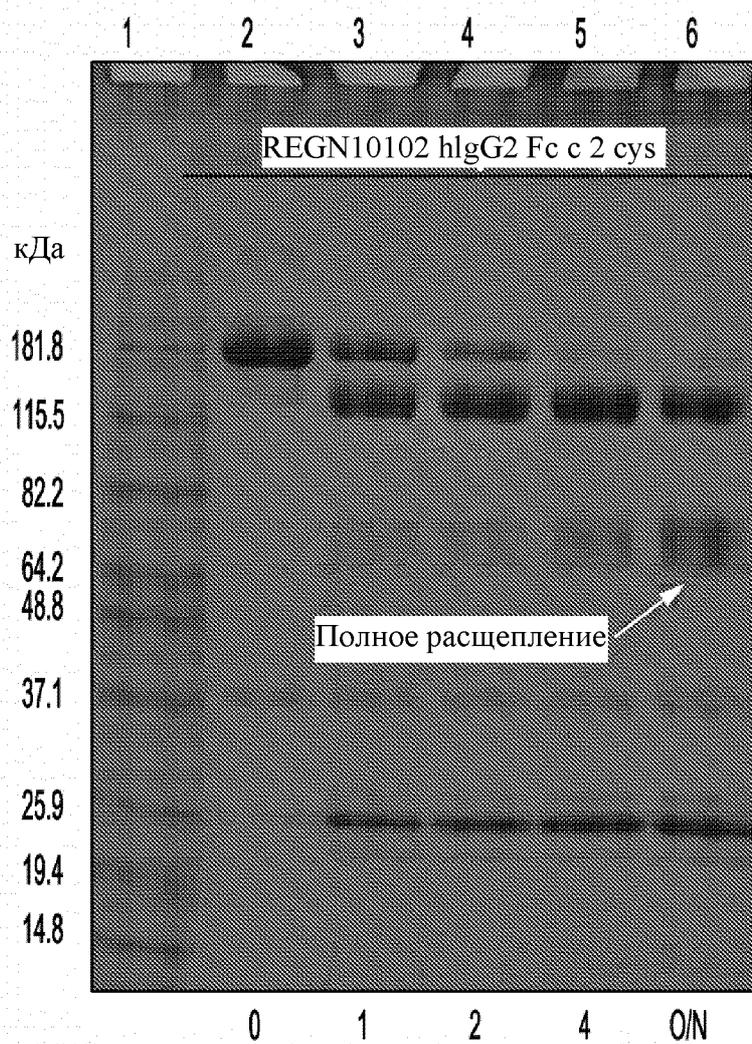
Фигура 9(Е)



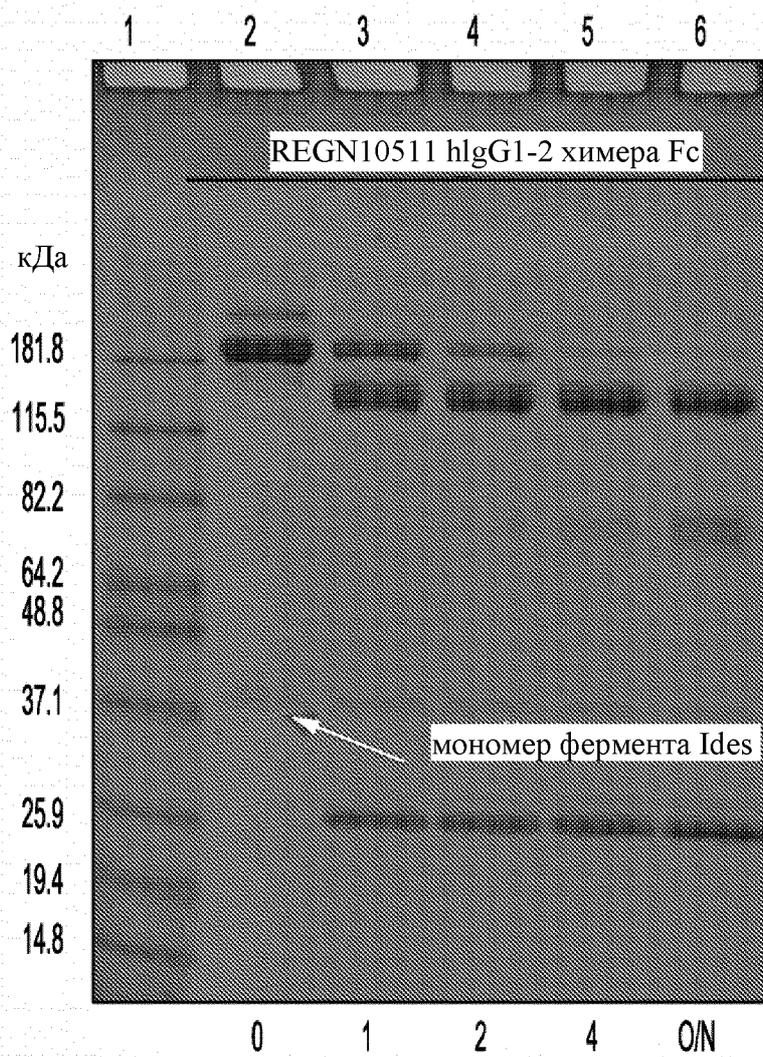
Фигура 10(A)



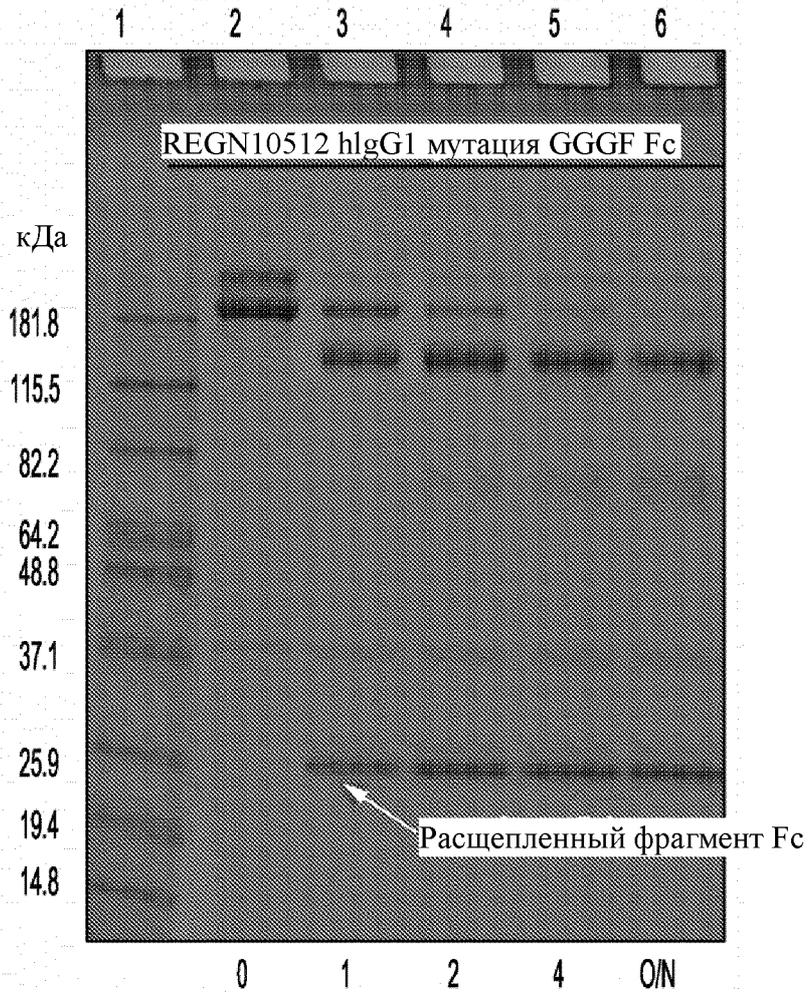
Фигура 10(В)



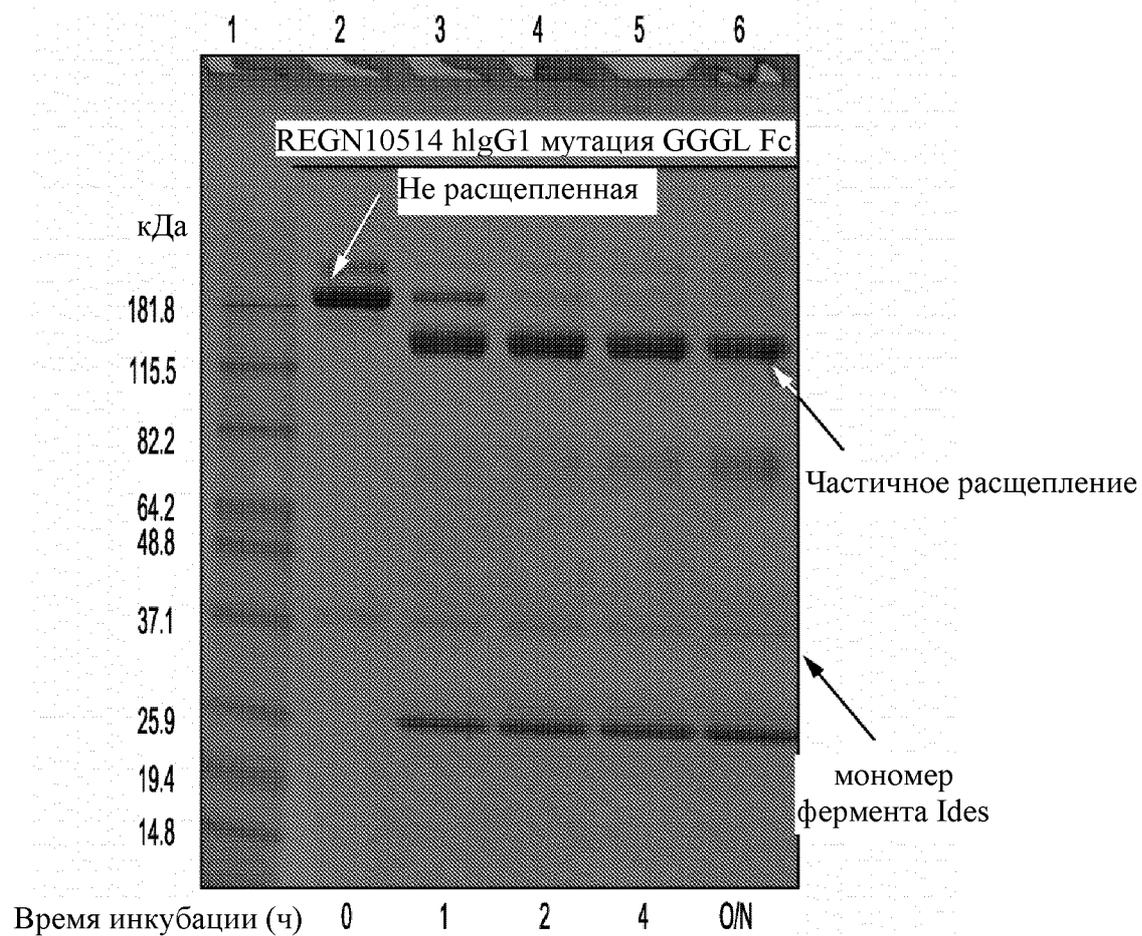
Фигура 10(С)



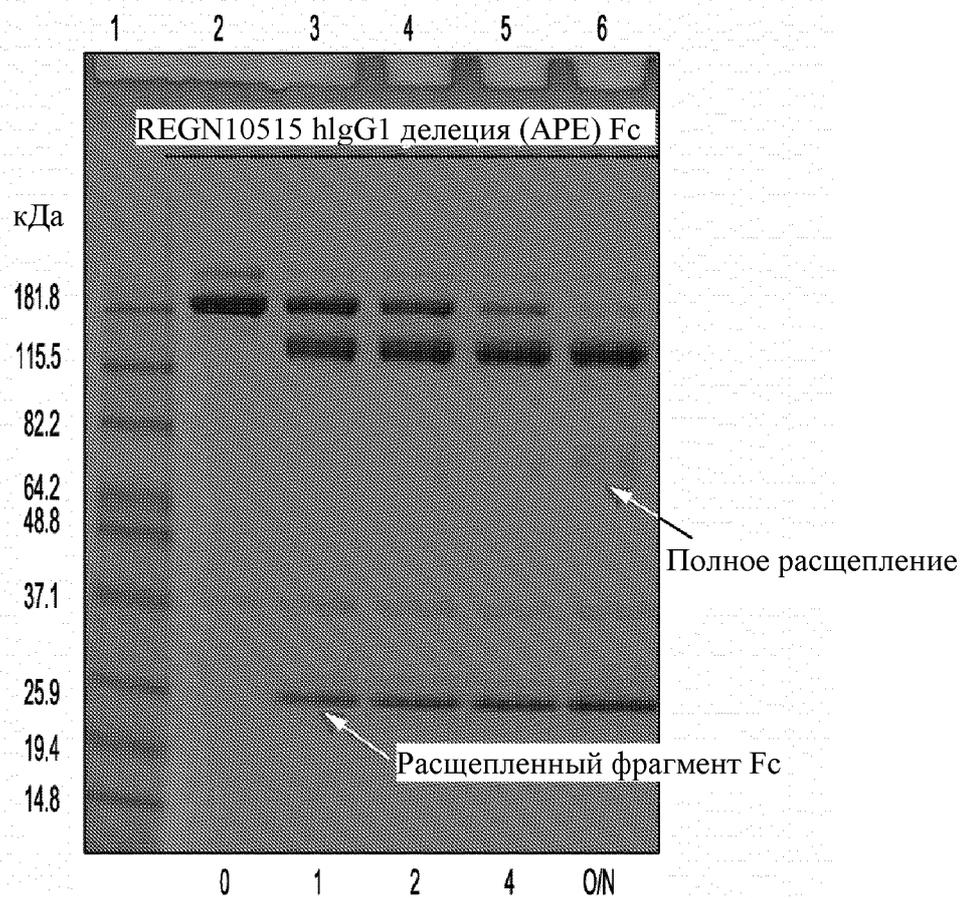
Фигура 10(D)



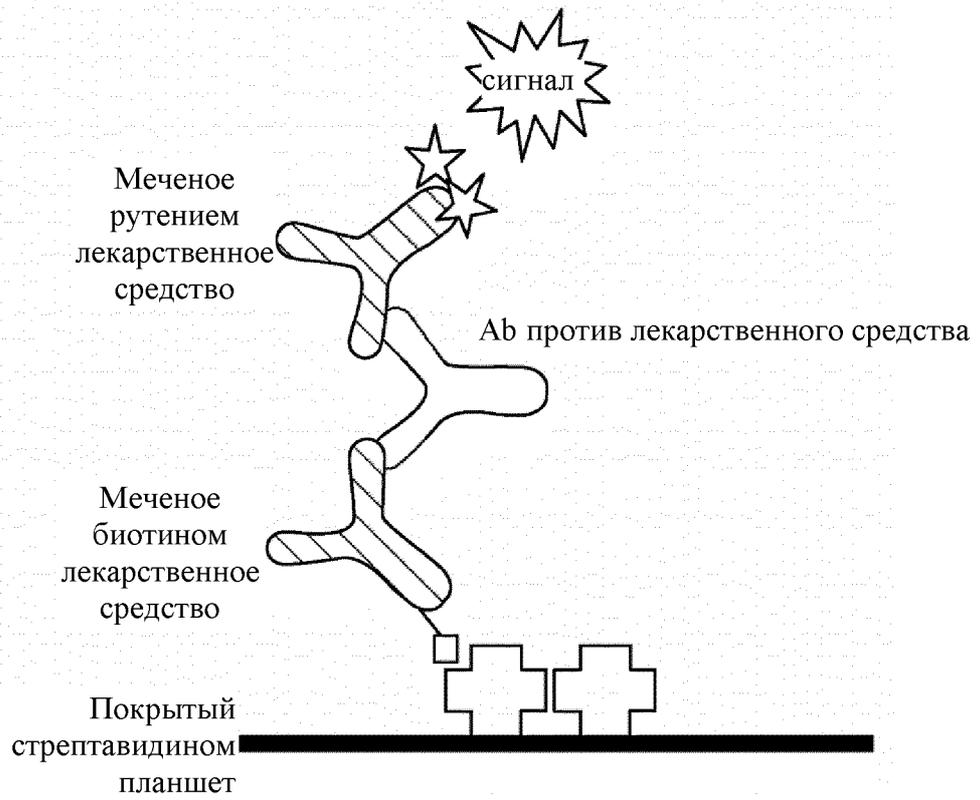
Фигура 10(Е)



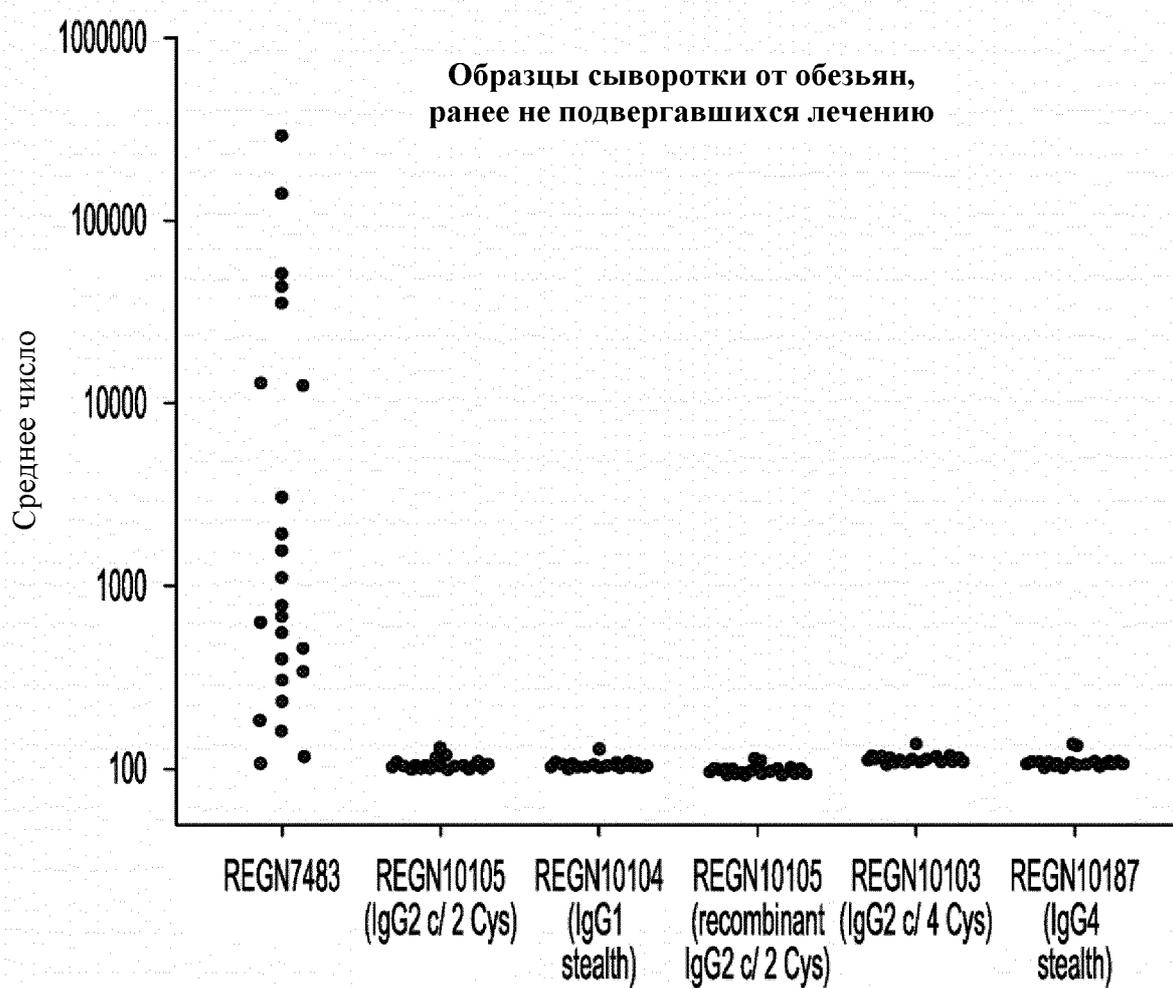
Фигура 10(F)



Фигура 11(A)



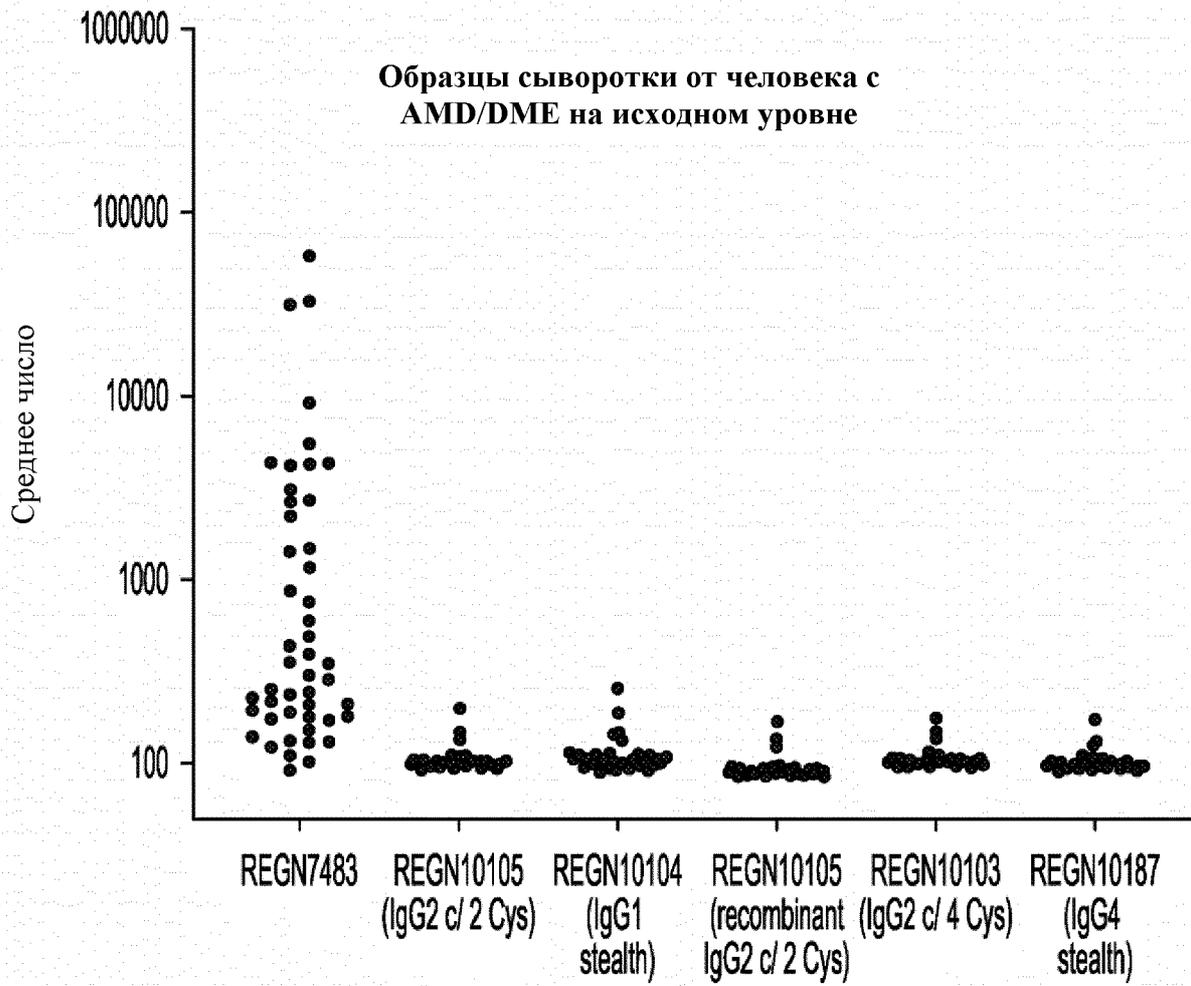
Фигура 11(В)



Stealth - стелс

Recombinant - рекомбинантный

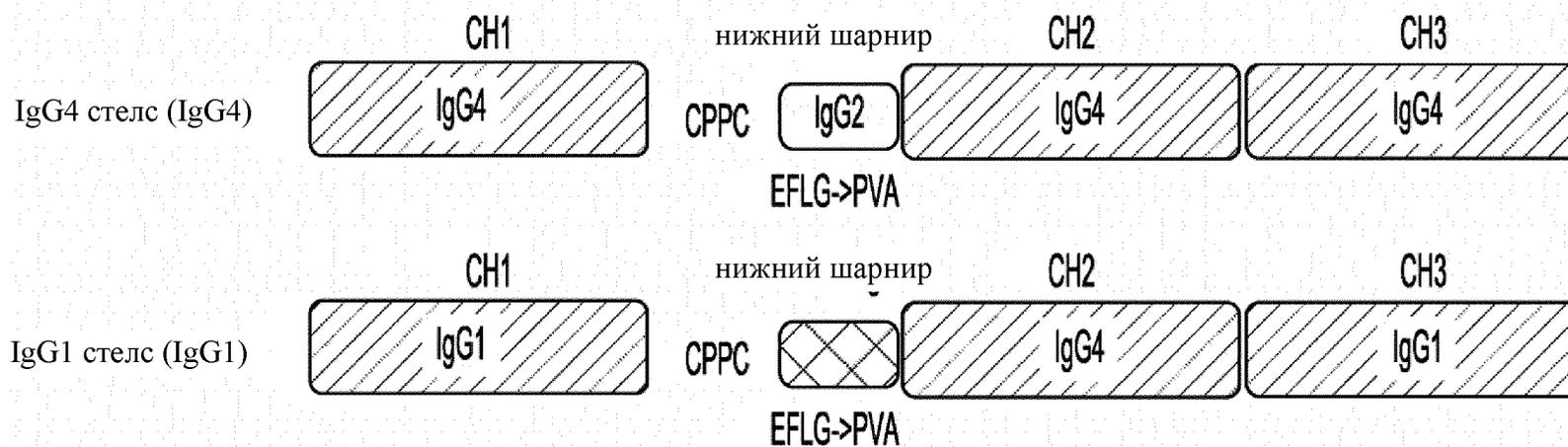
Фигура 12



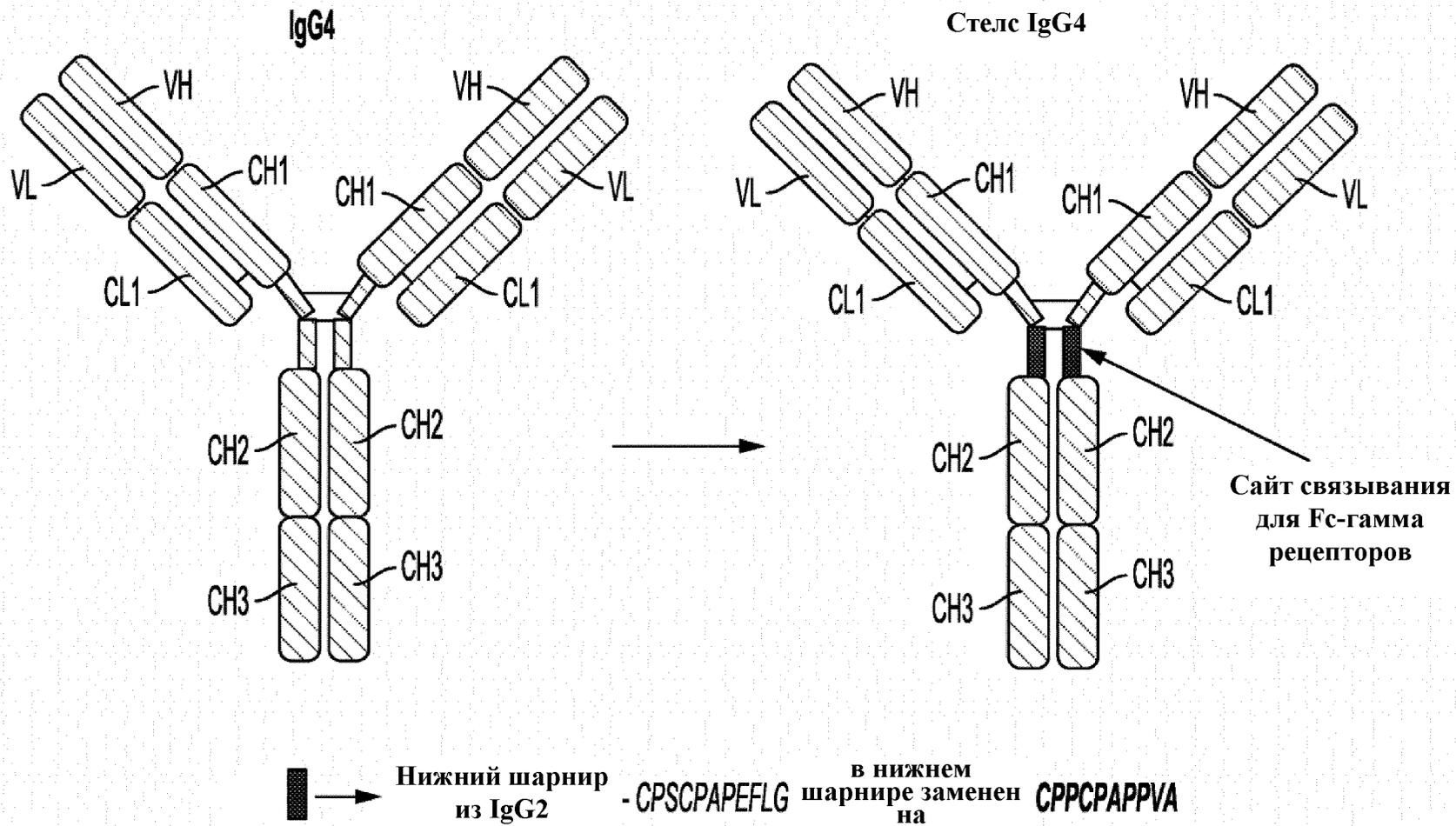
Stealth - стелс

Recombinant - рекомбинантный

Фигура 13



Фигура 14



Фигура 15

## IgG4 с нижним шарниром IgG2

Последовательность конструкции заключена в рамку

Перекрестные идентичности подчеркнуты

|---- CH2 ->

IGG1	...DKKAEPKSCD	KTHTCPPCPA	PELLGGPSVF	LFPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP	
IGG2	...DKTVERKCC-	--VECPCCPA	PP-VA	GPSVF	LFPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP
IGG4	...DKRVESKYGP	---PCPSCPA	PEFLGPSVF	LFPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSOEDP	

(Нижний шарнир)

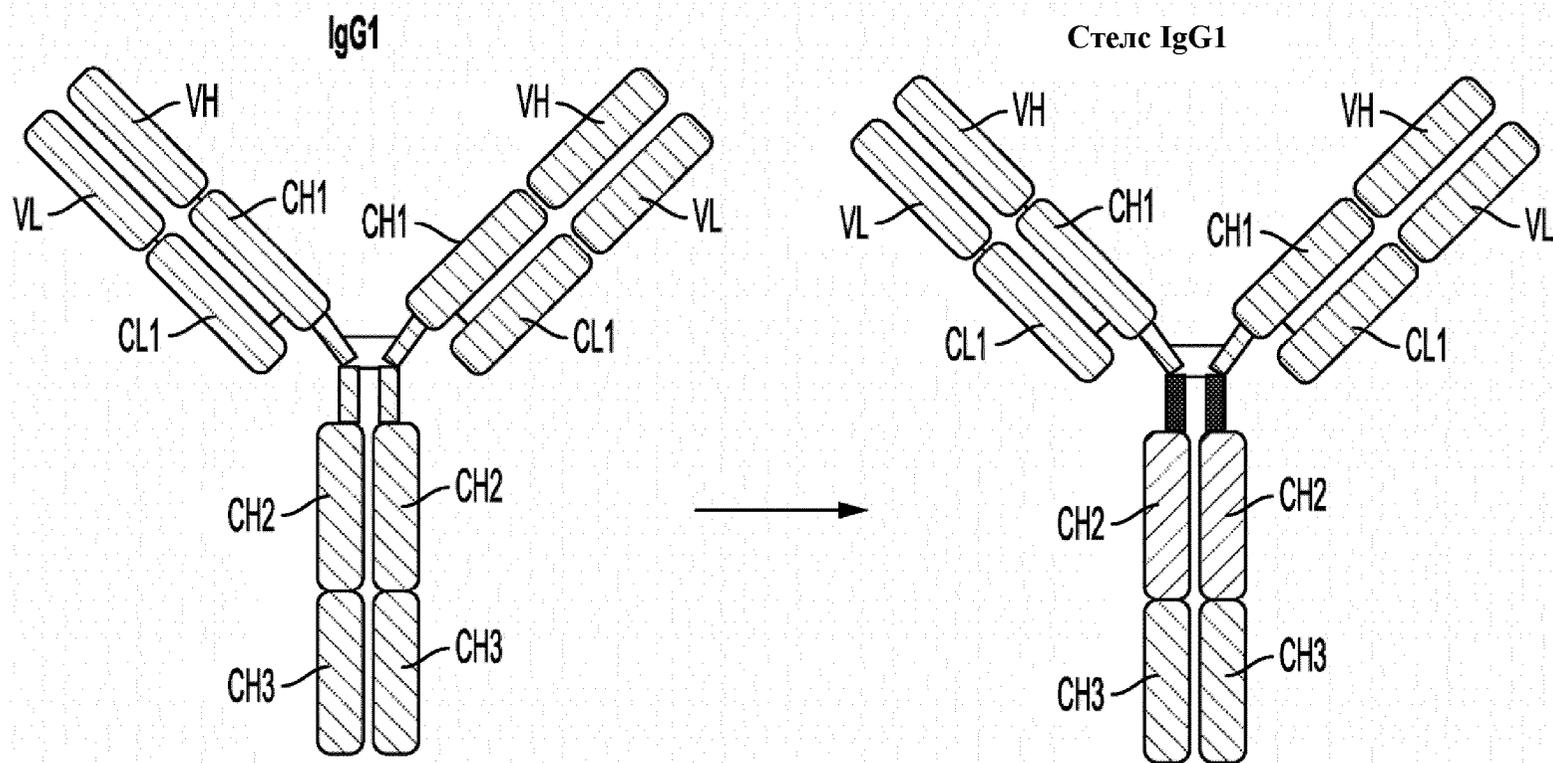
IGG1	EVKFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQYNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKALPAPI
IGG2	EVQFNWYVDG	MEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	VVSVLTVVHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPAPI
IGG4	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPSSI

|---- CH3 ->

IGG1	EKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSRDELTKN	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY
IGG2	EKTISKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY
IGG4	EKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSQEEMTKN	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY

IGG1	KTTPPVLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK*
IGG2	KTTPPMLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK*
IGG4	KTTPPVLDSD	GSFFLYSRLT	VDKSRWQEGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSL GK*

Фигура 16



■ → Нижний шарнир - CPPCPAPELLG из IgG2 в нижнем шарнире заменен на CPPCPAPPVA и домен CH2 из IgG4

Фигура 17

## IgG1 с безэффекторным CH2

Последовательность конструкции заключена в рамку

Перекрестные идентичности подчеркнуты

|---- CH2 -->

```

IGG1 ... DKKAEPKSCD KTHTPPCPA PELLGGPSVF LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
IGG2 ... DKTVERKCC- --VCPPCPA PP-VAGPSVF LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
IGG4 ... DKRVESKYGP ---PCPSCPA PEFLGGPSVF LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP

```

(Нижний шарнир)

```

IGG1 EVKFNWYVDC VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAPI
IGG2 EVQFNWYVDC MEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNKGLPAPI
IGG4 EVQFNWYVDC VEVHNAKTKP REEQFNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKGLPSSI

```

|---- CH3 -->

```

IGG1 EKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
IGG2 EKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
IGG4 EKTISKAKG QPREPQVYTL PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY

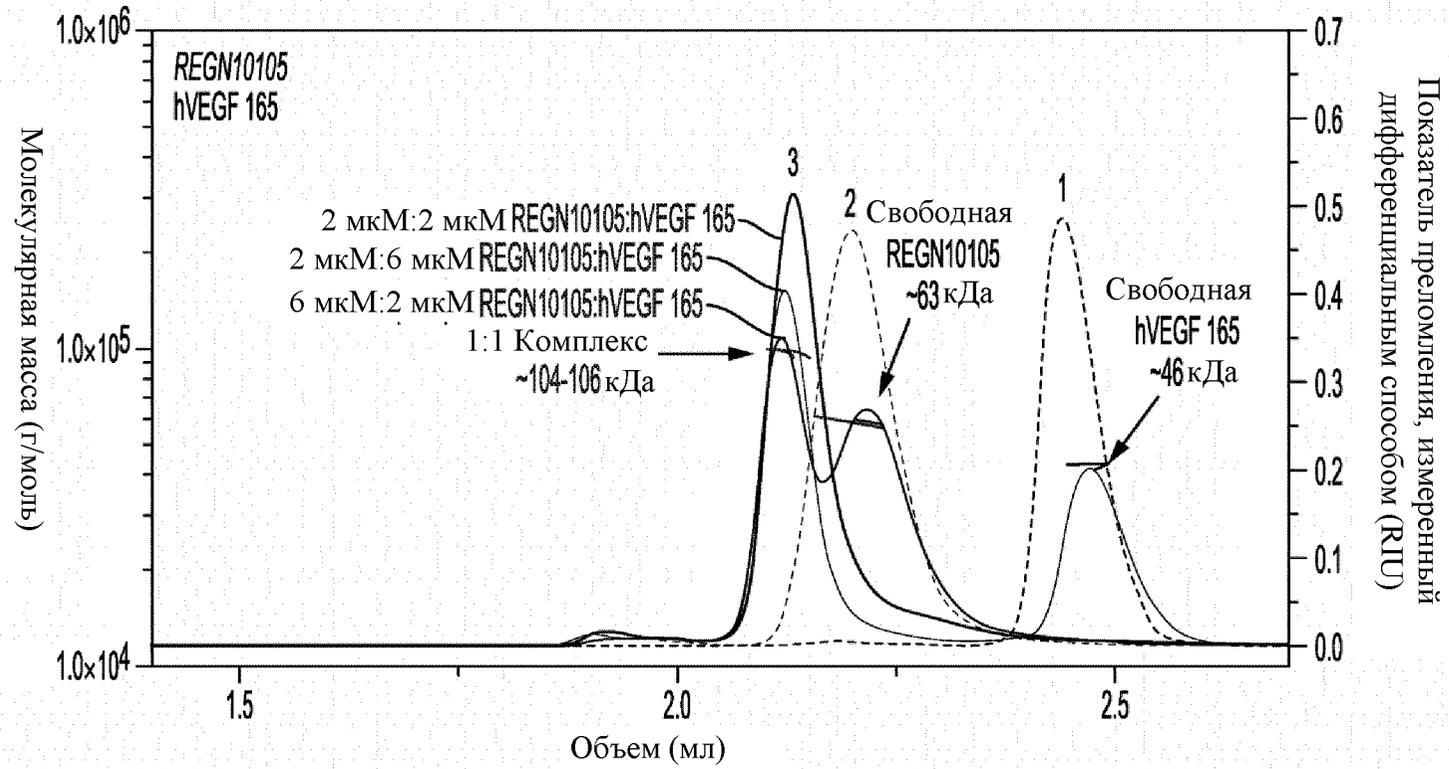
```

```

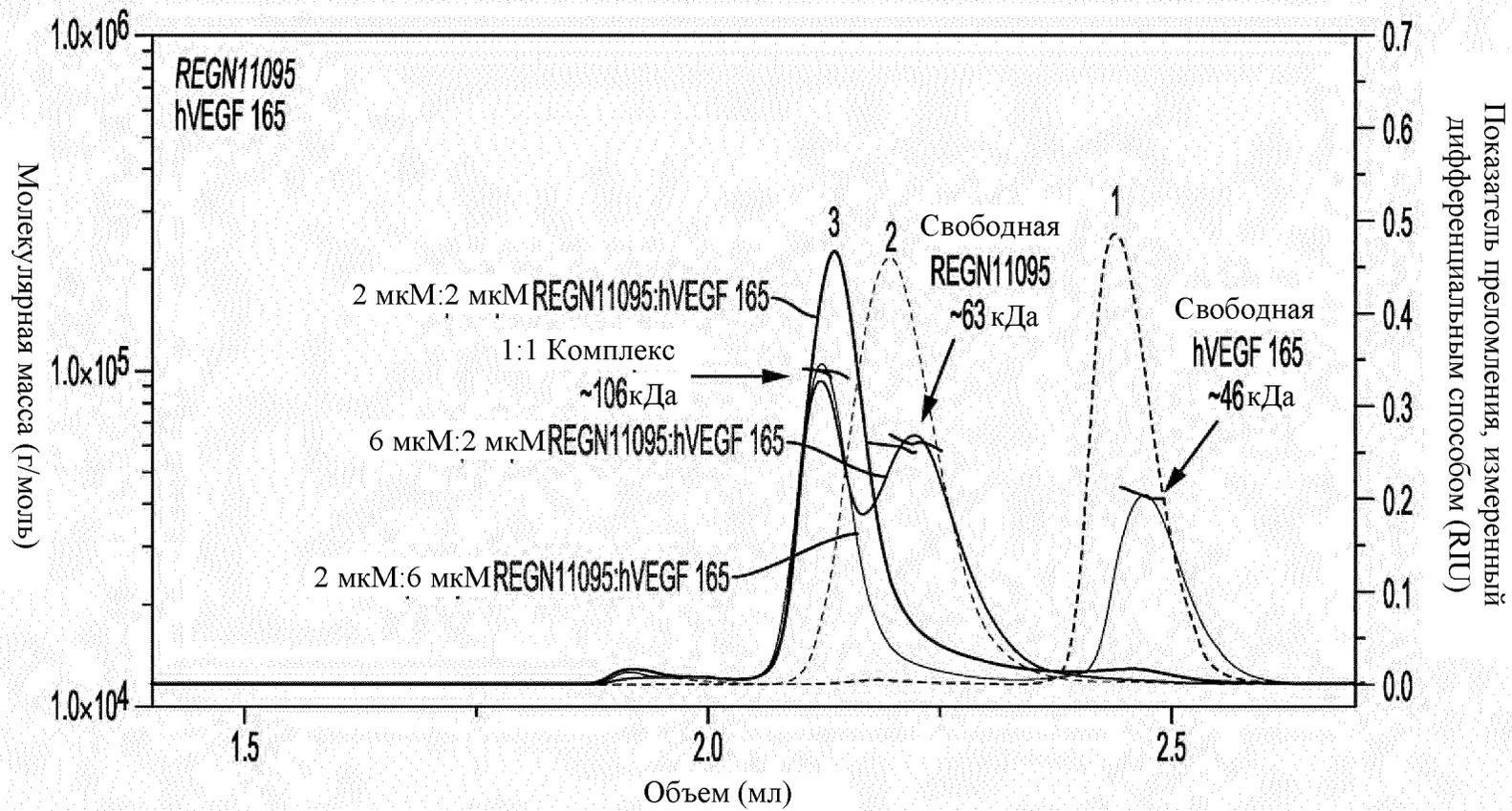
IGG1 KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSFGK*
IGG2 KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSFGK*
IGG4 KTTPPVLDSD GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLCK*

```

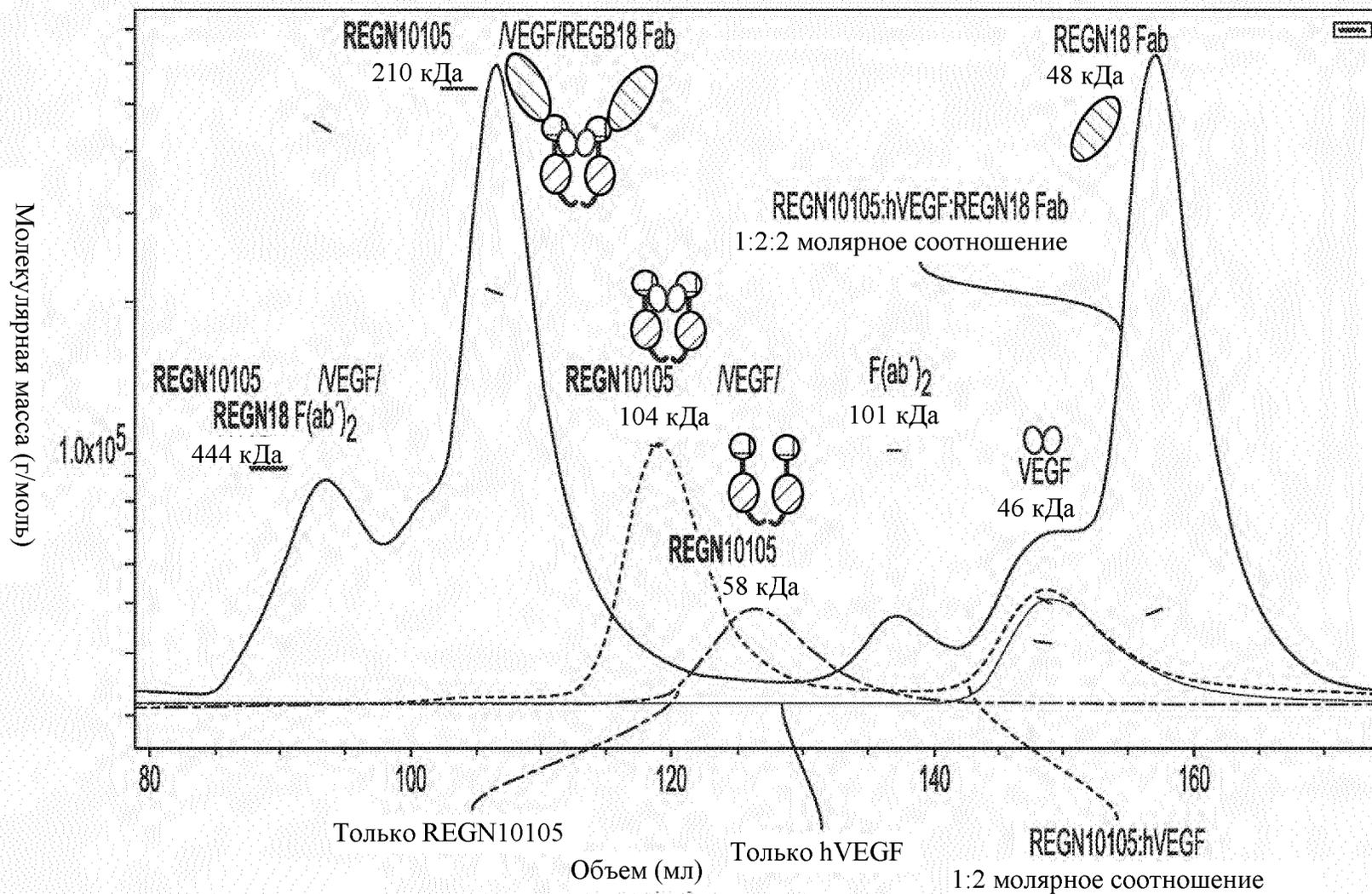
Фигура 18(А)



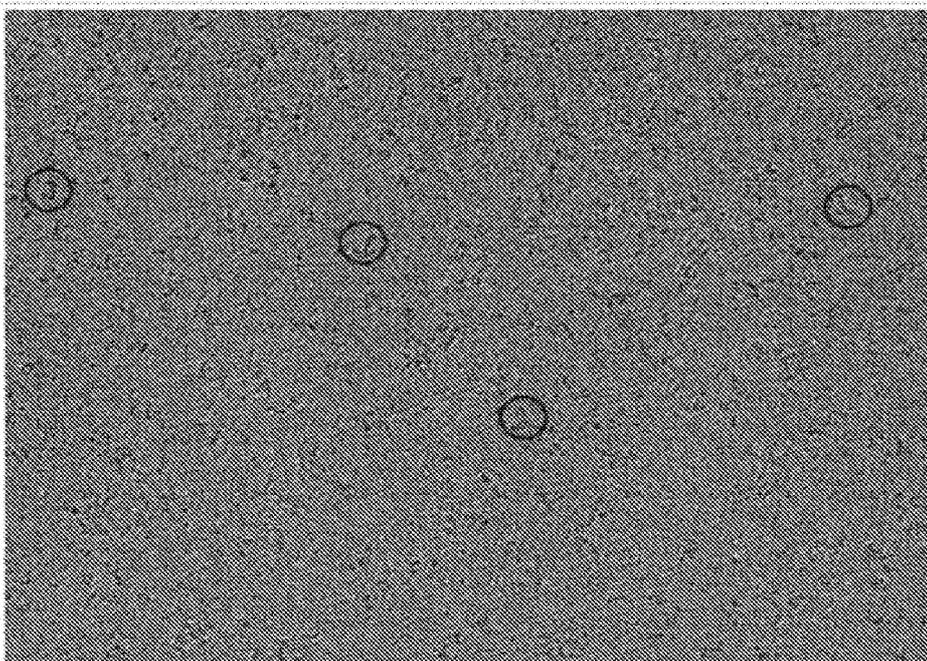
Фигура 18(В)



Фигура 19(А)



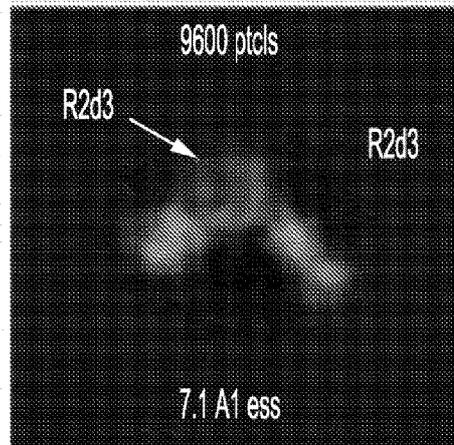
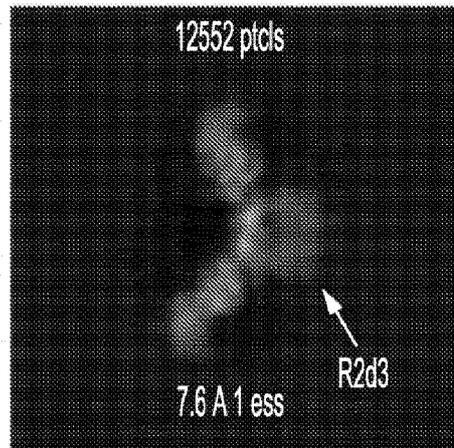
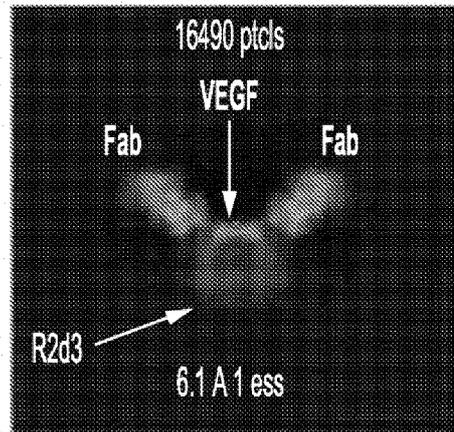
Фигура 19(В)



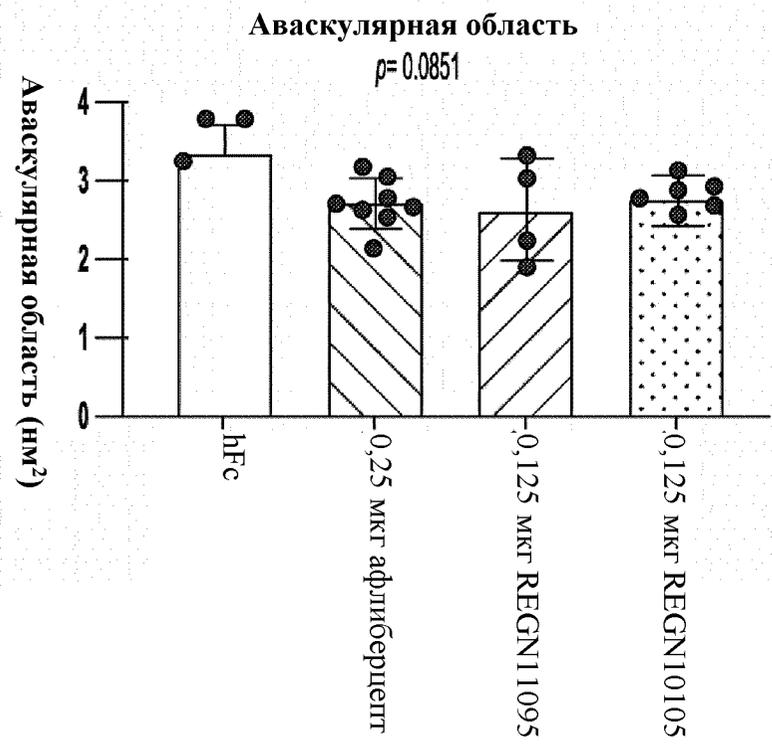
Фигура 19(С)

16325 ptcls 	16490 ptcls 	15935 ptcls 	13722 ptcls 	12552 ptcls 	12230 ptcls 	12062 ptcls 	11593 ptcls 	11263 ptcls 	10964 ptcls 
5.9 A 1 ess	6.1 A 1 ess	5.9 A 1 ess	6.1 A 1 ess	7.6 A 1 ess	8.2 A 1 ess	7.2 A 1 ess	5.8 A 1 ess	9.0 A 1 ess	6.4 A 1 ess
9970 ptcls 	9969 ptcls 	9731 ptcls 	9669 ptcls 	9600 ptcls 	9779 ptcls 	9087 ptcls 	8883 ptcls 	8710 ptcls 	8625 ptcls 
6.9 A 1 ess	4.9 A 1 ess	6.5 A 1 ess	6.2 A 1 ess	7.1 A 1 ess	7.2 A 1 ess	5.8 A 1 ess	9.5 A 2 ess	6.8 A 1 ess	5.9 A 1 ess
8571 ptcls 	8534 ptcls 	8433 ptcls 	8264 ptcls 	8121 ptcls 	8109 ptcls 	8007 ptcls 	7953 ptcls 	7944 ptcls 	7492 ptcls 
8.0 A 1 ess	8.4 A 1 ess	5.9 A 1 ess	6.6 A 1 ess	7.1 A 1 ess	8.4 A 1 ess	6.7 A 1 ess	7.4 A 2 ess	6.6 A 1 ess	8.5 A 1 ess
7334 ptcls 	7244 ptcls 	7194 ptcls 	7143 ptcls 	6998 ptcls 	6714 ptcls 	6691 ptcls 	6641 ptcls 	6465 ptcls 	6042 ptcls 
5.8 A 1 ess	5.9 A 1 ess	5.9 A 1 ess	5.9 A 1 ess	6.1 A 1 ess	7.7 A 1 ess	5.9 A 1 ess	7.0 A 1 ess	6.9 A 1 ess	8.7 A 1 ess

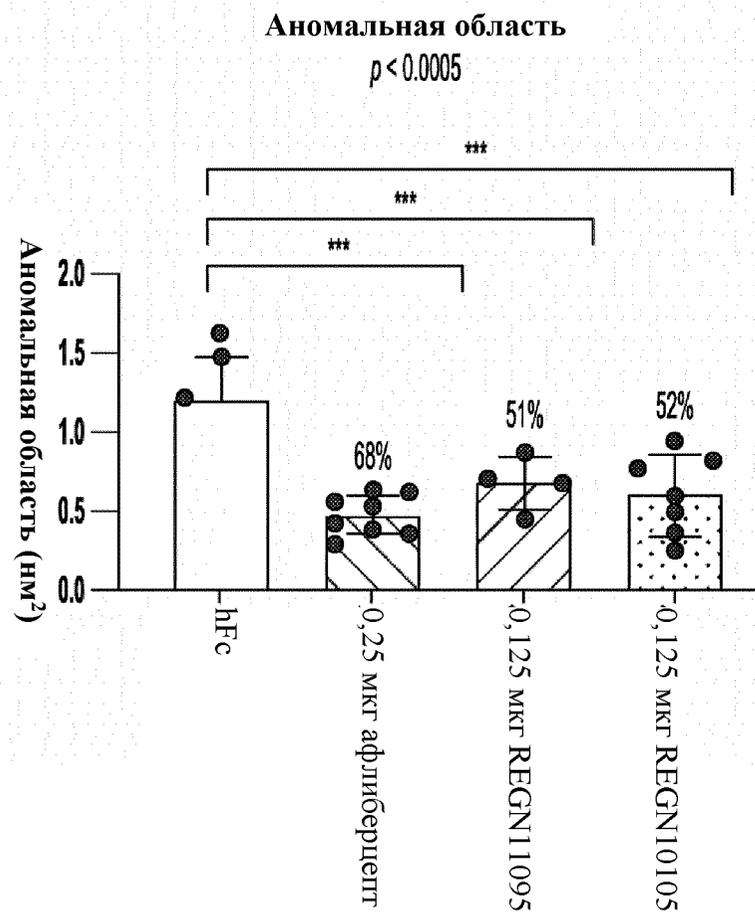
Фигура 19(D)



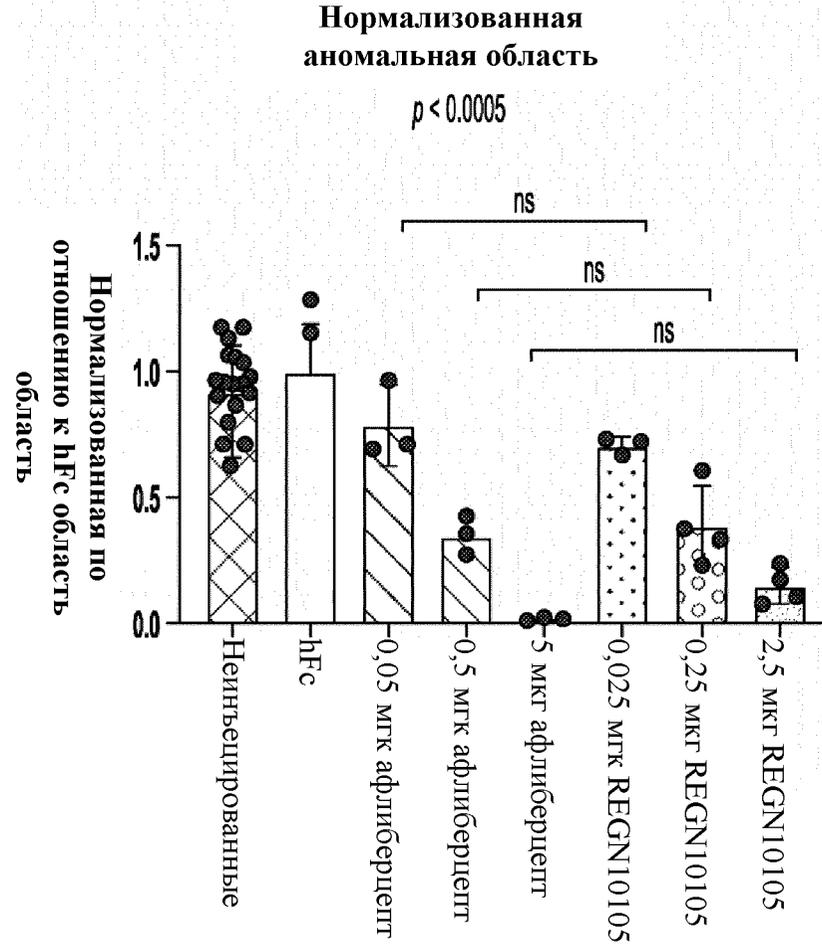
Фигура 20(А)



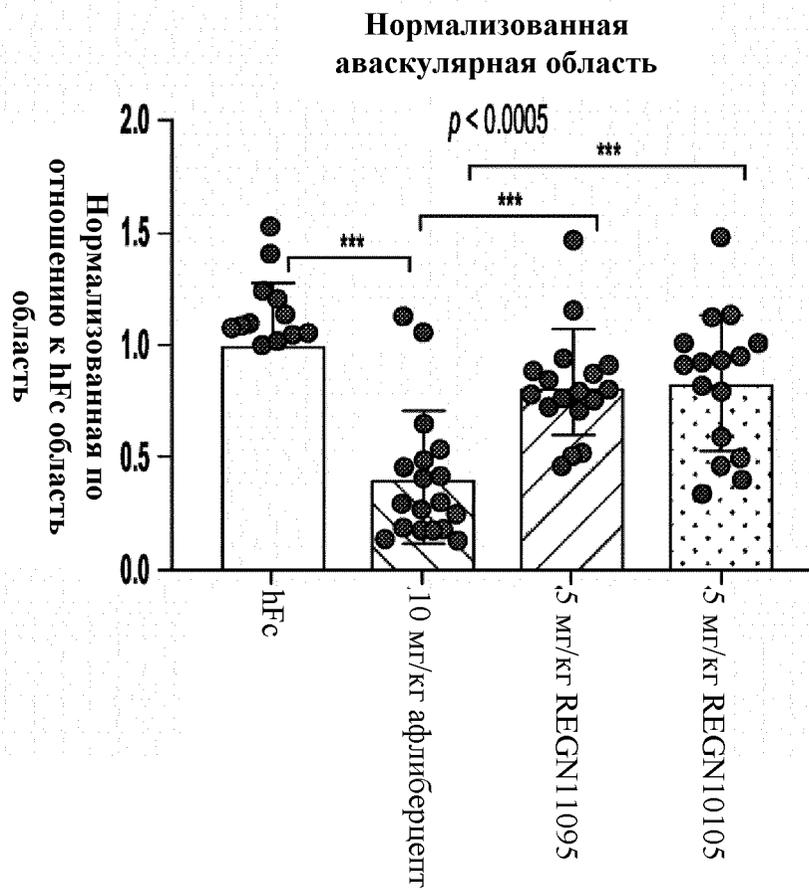
Фигура 20(В)



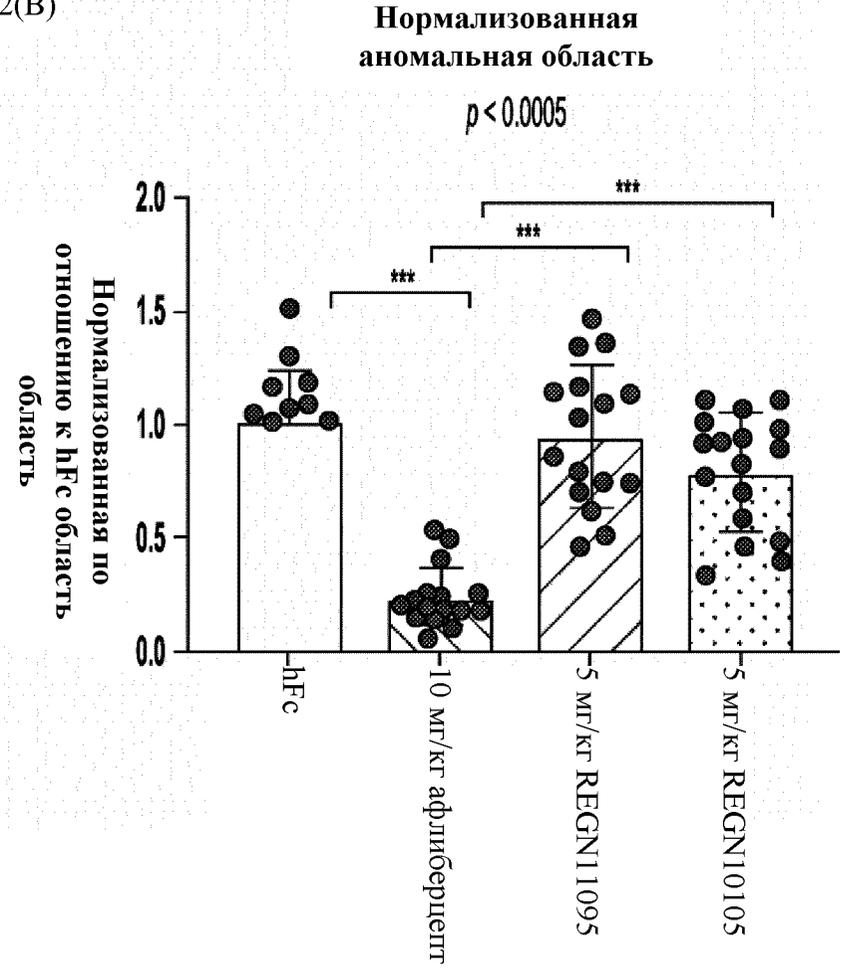
Фигура 21



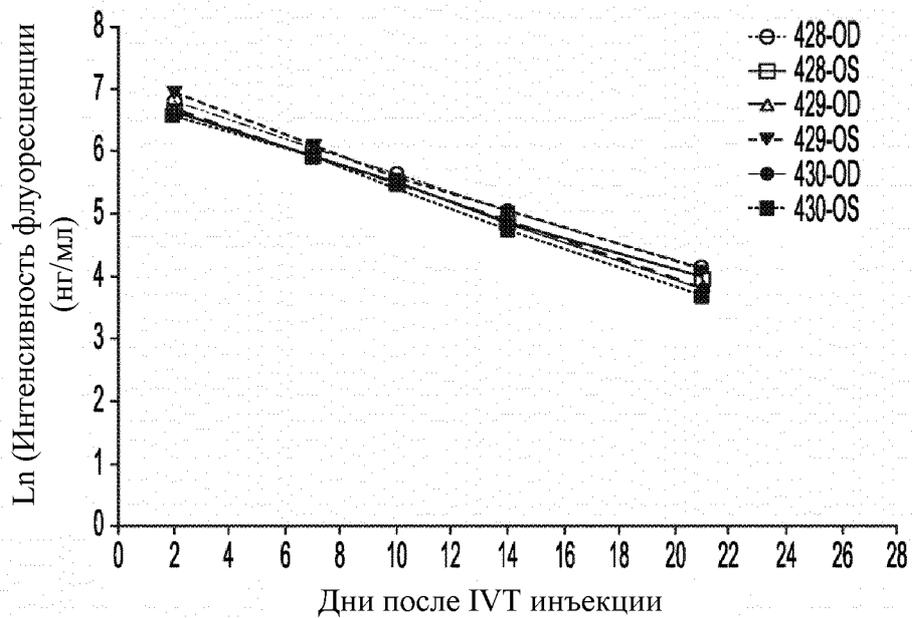
Фигура 22(А)



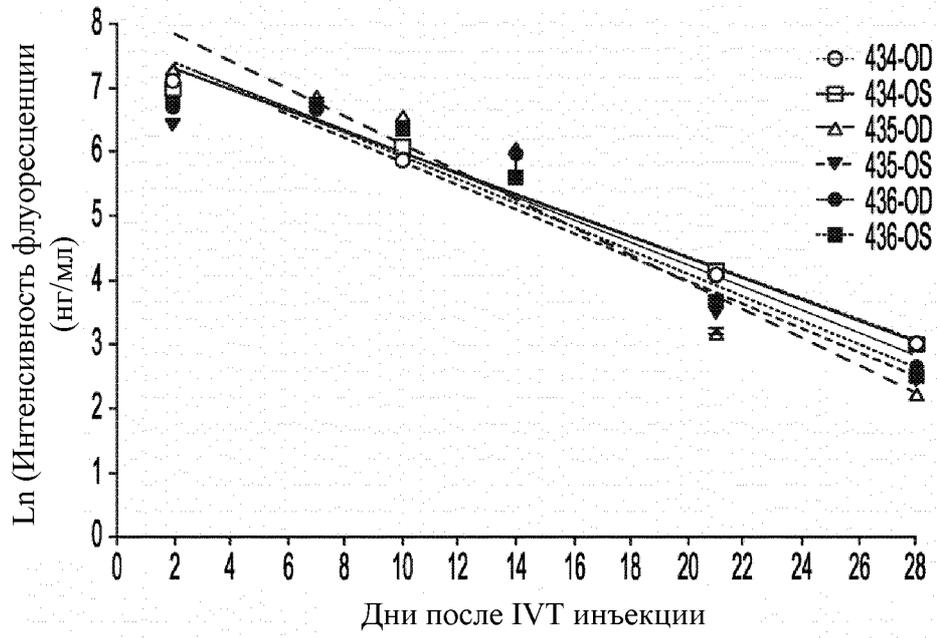
Фигура 22(В)



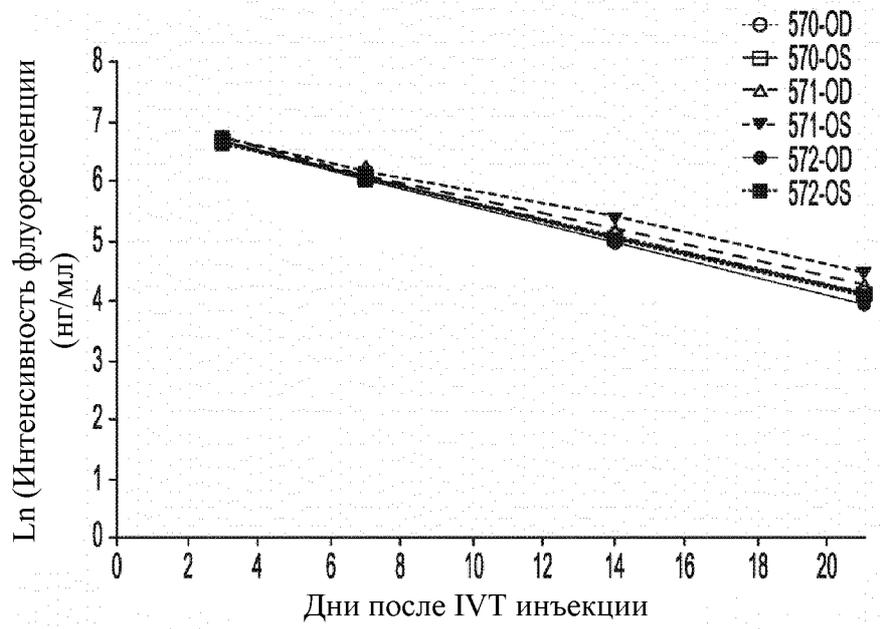
Фигура 23(А)



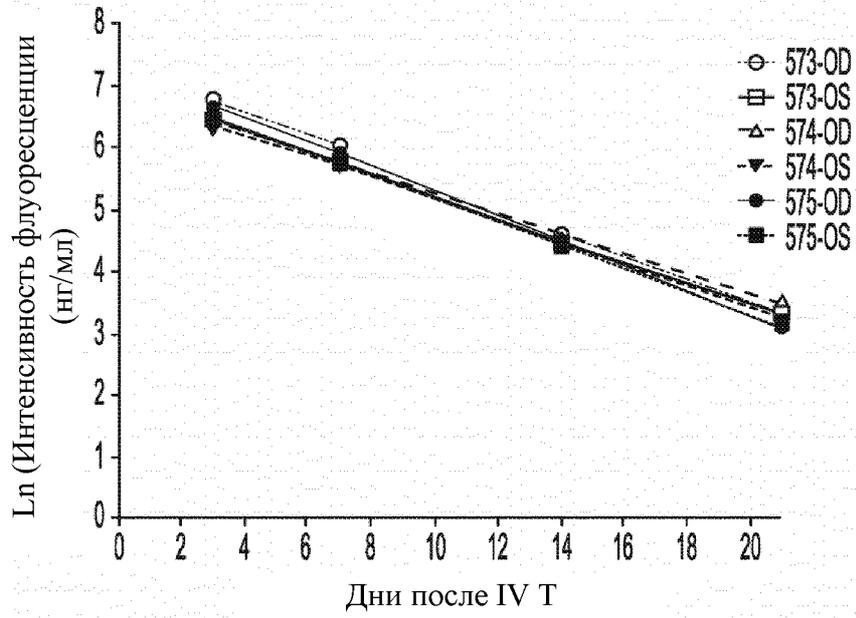
Фигура 23(В)



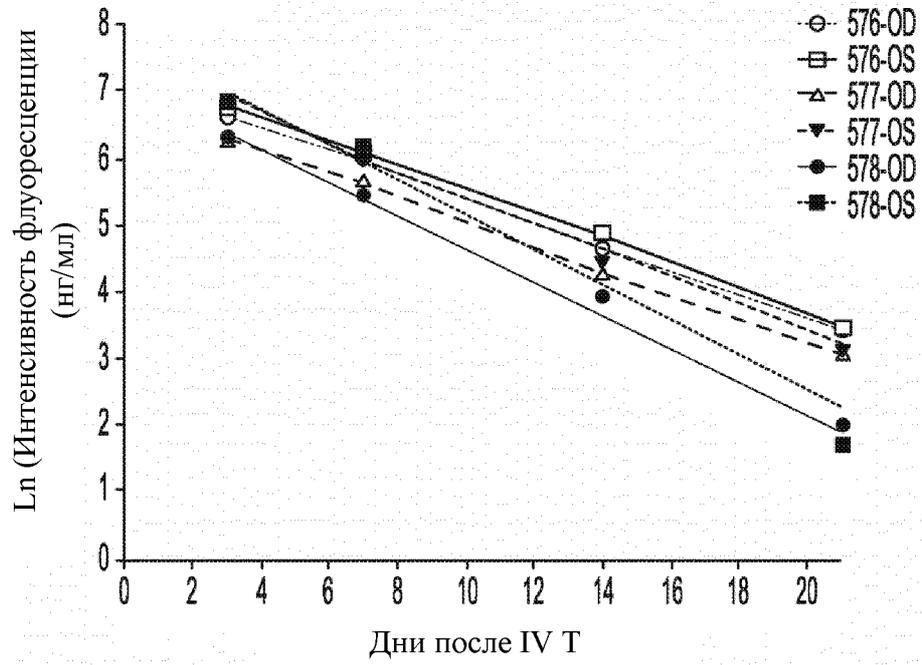
Фигура 23(С)



Фигура 23(D)

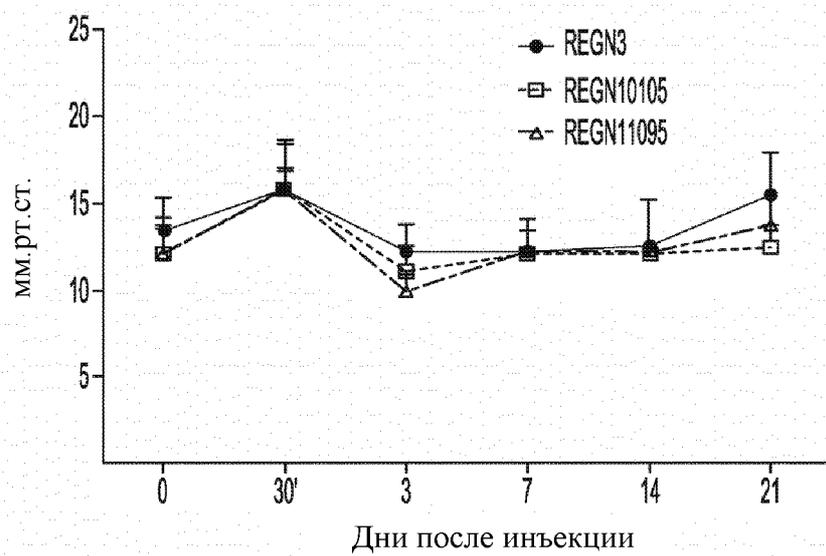


Фигура 23(Е)

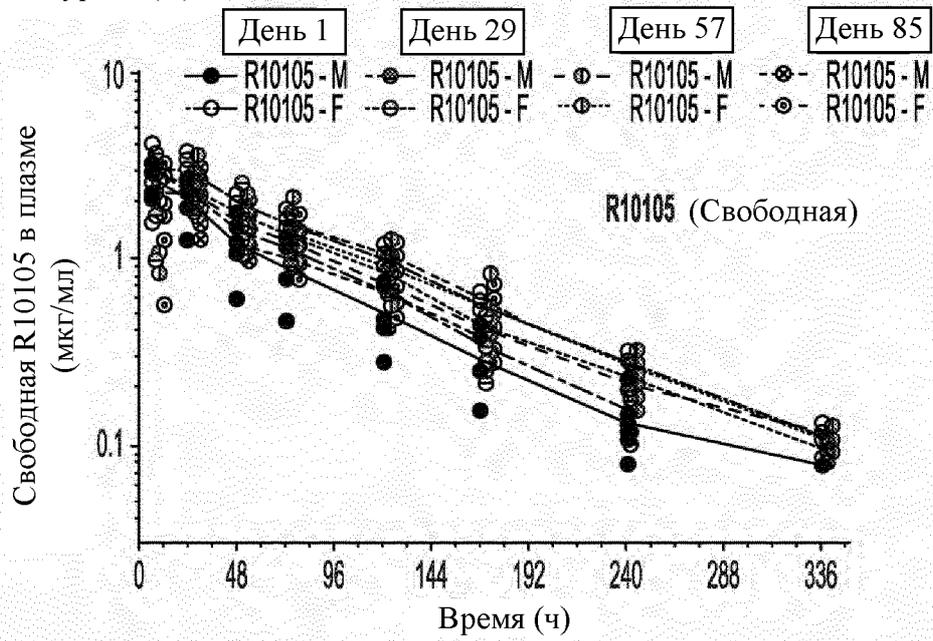


Фигура 23(F)

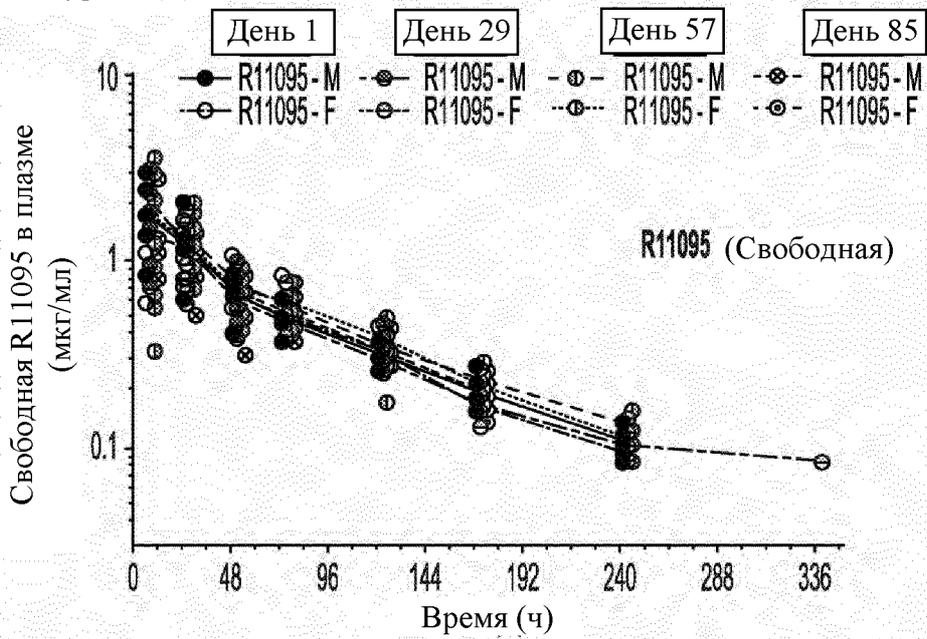
Внутриглазное давление (мм.рт.ст.)



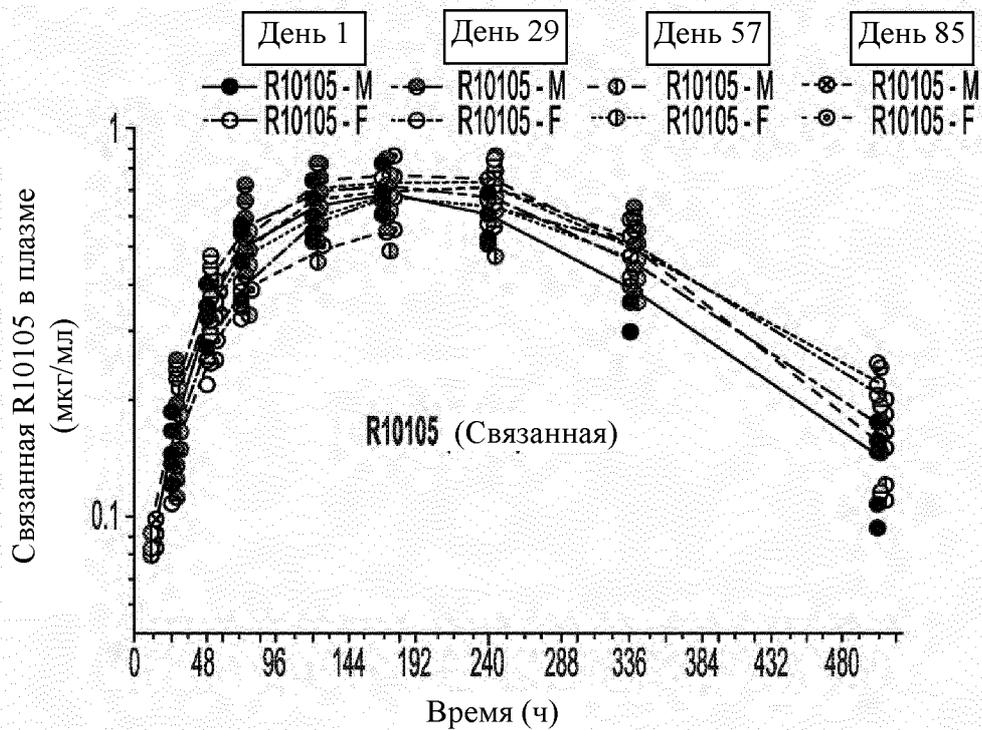
Фигура 24(А)



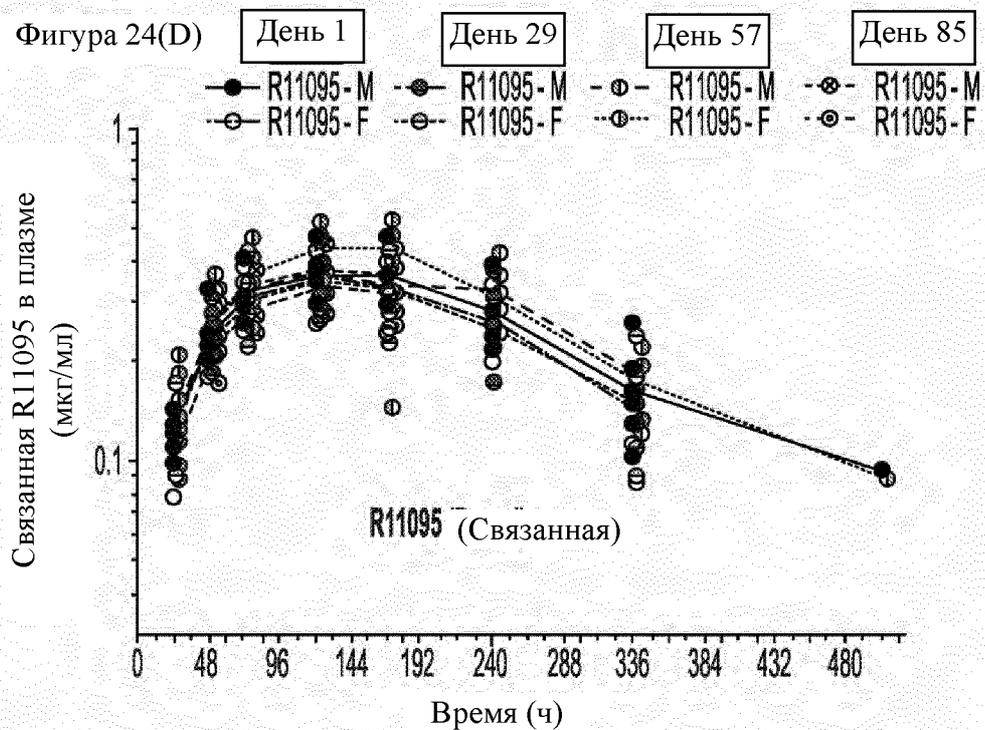
Фигура 24(В)



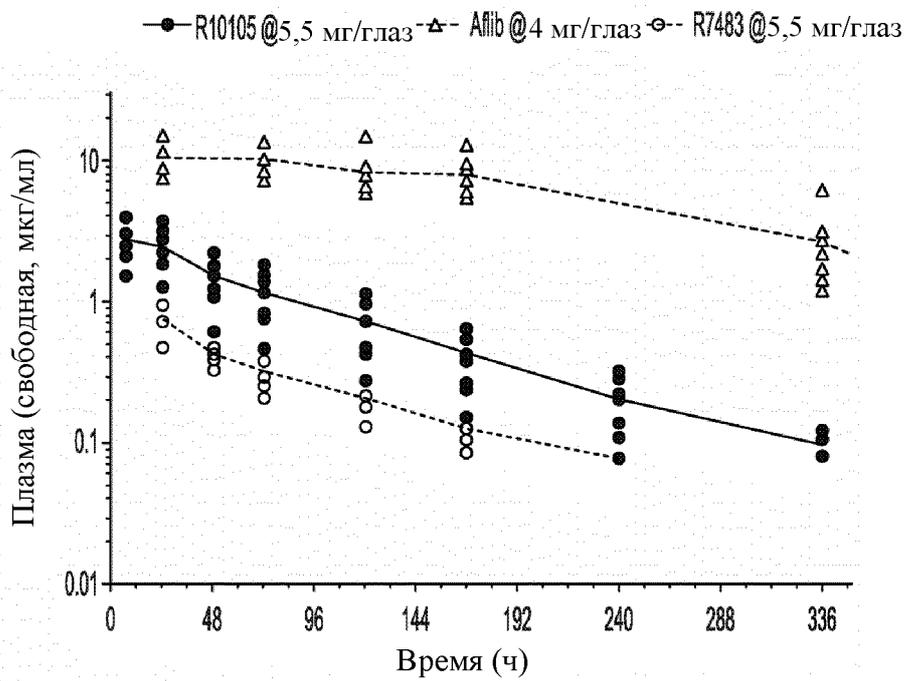
Фигура 24(С)



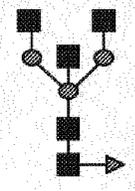
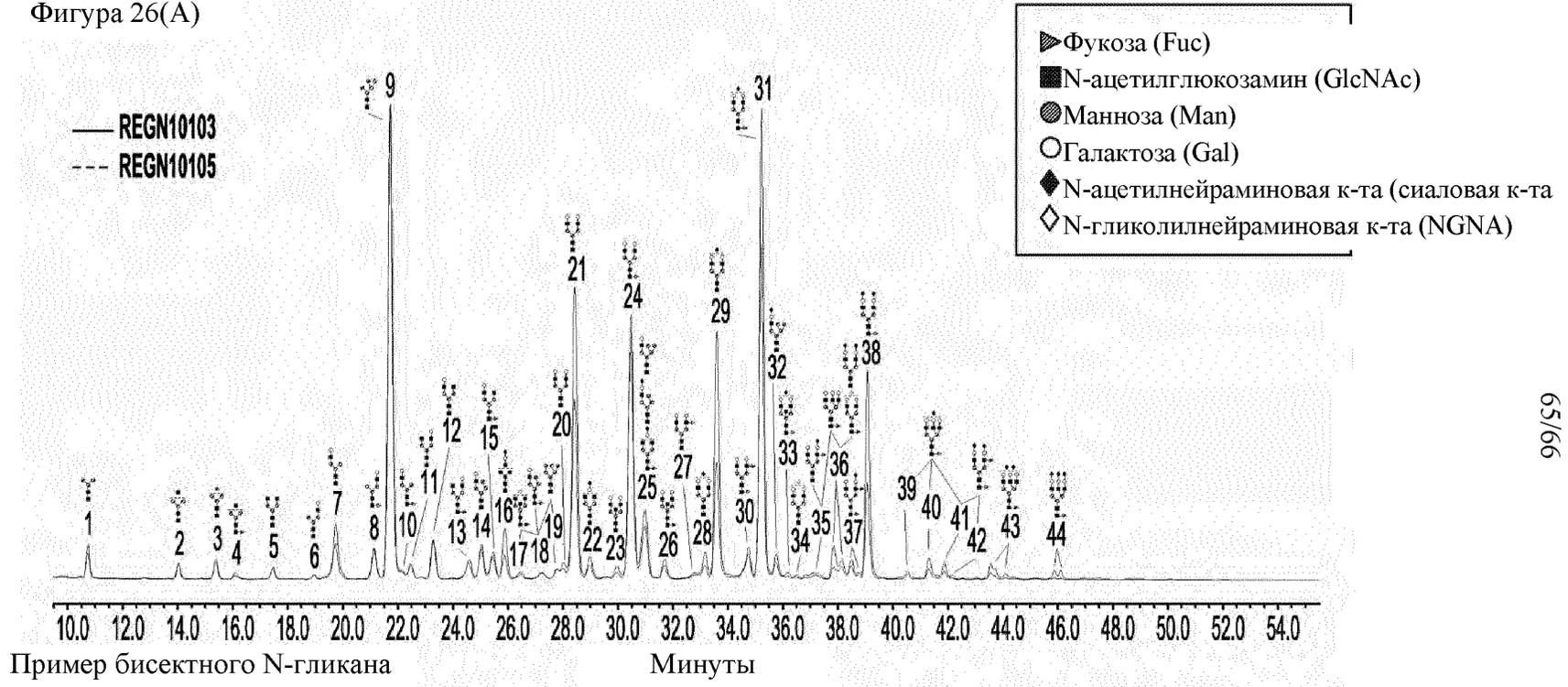
Фигура 24(D)



Фигура 25



Фигура 26(А)



Фигура 26(В)

