



УКРАЇНА

(19) **UA**(11) **122673**(13) **C2**

(51) МПК

C07K 16/24 (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 27/02** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2017 05592	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
(22) Дата подання заявки:	06.11.2015	WO 2014074905 A1, 15.05.2014
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	29.12.2020	WO 2007076927 A1, 12.07.2007
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/077,105, 62/087,448, 62/247,705	WO 2008144763 A2, 27.11.2008
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	07.11.2014, 04.12.2014, 28.10.2015	Kalai M. et al. Analysis of the mechanism of action of anti-human interleukin-6 and anti-human interleukin-6 receptor-neutralising monoclonal antibodies. European journal of biochemistry, 1997, Vol. 249, no. 3, P. 690 - 700
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US	Finch D.K. et al. Whole-Molecule Antibody Engineering: Generation of a High-Affinity Anti-IL-6 Antibody with Extended Pharmacokinetics. Journal of molecular biology, 2011, Vol. 411, no. 4, P. 791 - 807
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.09.2017, Бюл.№ 18	US 6277375 B1, 21.08.2001
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	28.12.2020, Бюл.№ 24	WO 2004045507 A2, 03.06.2004
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2015/059532, 06.11.2015	Rudikoff S. et al. Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity. Proceedings of the national academy of sciences, 1982, Vol. 79, P. 1979 - 1983
(72) Винахідник(и): Шмідт Майкл Марч (US), Тісдейл Елісон (US), Ферфайн Ерік Стівен (US), Зарбіс-Папастойтсіс Грігоріос (US)		Winkler K. et al. Changing the antigen binding specificity by single point mutations of an anti-p24 (HIV-1) antibody. The journal of immunology, 2000, Vol. 165, no. 8, P. 4505 - 4514
(73) Володілець (володільці): ЕЛЕВЕН БАЙОТЕРАПЬЮТИКС, ІНК., 215 First Street, Suite 400, Cambridge, MA 02142, United States of America (US)		Chien N. C. et al. Significant structural and functional change of an antigen-binding site by a distant amino acid substitution: Proposal of a structural mechanism. proceedings of the national academy of sciences, 1989, Vol. 86, no. 14, P. 5532 - 5536
(74) Представник: Кислиця Тетяна Олегівна, реєстр. №425		Panka D. J. et al. Defining the structural correlates responsible for loss of arsonate affinity in an Id antibody isolated from an autoimmune mouse. Molecular immunology, 1993, Vol. 30, no. 11, P. 1013 - 1020

(54) АНТИТИЛО, ЩО СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ЛЮДСЬКИМ IL-6**(57) Реферат:****UA 122673 C2**

Винахід стосується виділеного антитіла або антигензв'язуючого фрагмента, що специфічно зв'язується з людським IL-6. Також винахід стосується композиції для лікування очної хвороби, застосування терапевтично ефективної кількості антитіла IL-6 у виготовленні лікарського засобу, нуклеїнової кислоти, вектора та клітини.

Дана заявка претендує на пріоритет попередньої заявки США № 62/077105, поданої 7 листопада 2014 р.; попередньої заявки США № 62/087448, поданої 4 грудня 2014 р.; та попередньої заявки США № 62/247705, поданої 28 жовтня 2015 р. Зміст кожної з цих заявок в повному обсязі включений до даного документу шляхом посилання.

5 ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Даний винахід стосується IL-6. Більш конкретно, винахід стосується модуляторів IL-6 та їх застосування у лікуванні хвороби, такої як хвороби ока.

ВІДОМИЙ РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

10 IL-6 є плеїотропним цитокином з описаними ролями у запаленні, гемопоезі, ангиогенезі, клітинній диференціації та нейрональному виживанні. Даний винахід стосується удосконалених антитіл IL-6 та їх застосування.

СУТЬ ВІНАХОДУ

Винахід стосується антитіл IL-6 та їх фрагментів (наприклад, антигензв'язуючих фрагментів) або похідних, а також нуклеїнових кислот, що кодують антитіла IL-6 та фрагменти. Винахід 15 також стосується застосування таких антитіл, фрагментів або похідних. Антитіла та їх фрагменти або похідні можуть бути використані, наприклад, у лікуванні хвороби, асоційованої з IL-6. У варіантах реалізації, антитіло, його фрагмент або похідне може зв'язуватися (наприклад, специфічно зв'язуватися) з IL-6, наприклад, з людським IL-6. У варіантах реалізації, антитіло, його фрагмент або похідне може зв'язуватися (наприклад, специфічно зв'язуватися) із сайтом II 20 IL-6 (наприклад, сайтом II людського IL-6).

В одному аспекті, передбачуваному в даному документі, пропонується виділене антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає

(i) VH CDR1, що включає послідовність GYX₁LX₂NYLIE (SEQ ID NO:45),

(ii) VH CDR2, що включає послідовність VX₃TPGX₄GTIN (SEQ ID NO:46), та

25 (iii) VH CDR3,

причому виконуються одна чи декілька (наприклад, 1, 2, 3, або усі) з таких умов: X₁ не є A, X₂ не є S, X₃ не є I, і X₄ не є S. У варіантах реалізації, X₁ не є A, X₂ не є S, X₃ не є I, і X₄ не є S.

У варіантах реалізації, X₁ позначає V або консервативне заміщення V. У варіантах реалізації, X₂ позначає P або консервативне заміщення P. У варіантах реалізації, X₃ позначає T або консервативне заміщення T. У варіантах реалізації, X₄ позначає G або консервативне заміщення G. У варіантах реалізації, виконуються одна, дві, три або усі з таких умов: X₁ 30 позначає V або консервативне заміщення V, X₂ позначає P або консервативне заміщення P, X₃ позначає T або консервативне заміщення T, і X₄ позначає G або консервативне заміщення G. У варіантах реалізації, X₁ позначає V або консервативне заміщення V, X₂ позначає P або консервативне заміщення P, X₃ позначає T або консервативне заміщення T, і X₄ позначає G або консервативне заміщення G. 35

У варіантах реалізації, X₁ вибирають з V, I, L та M. У варіантах реалізації, X₁ вибирають з V, I та L. У варіантах реалізації, X₂ вибирають з P, G, та A. У варіантах реалізації, X₂ вибирають з P та G. У варіантах реалізації, X₃ вибирають з T та S. У варіантах реалізації, X₄ вибирають з G та P. 40

У варіантах реалізації, виконуються одна чи декілька (наприклад, 1, 2, 3 або усі) з таких умов: X₁ позначає V, X₂ позначає P, X₃ позначає T, і X₄ позначає G. У варіантах реалізації, X₁ позначає V, X₂ позначає P, X₃ позначає T, і X₄ позначає G.

У варіантах реалізації, VH CDR3 включає послідовність SEQ ID NO:33.

45 У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до людського IL-6 і/або підвищену ефективність. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до людського IL-6 і/або підвищену ефективність у порівнянні з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом (наприклад, ідентичним в інших відношеннях антитілом або антигензв'язуючим фрагментом), що включає 50 послідовність, причому виконуються одна чи декілька (наприклад, 1, 2, 3, або усі) з таких умов: X₁ позначає A, X₂ позначає S, X₃ позначає I і X₄ позначає S.

В деяких варіантах реалізації, виділене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить VH CDR1, що включає послідовність SEQ ID NO:31, VH CDR2, що включає послідовність SEQ ID NO:32, та необов'язково VH CDR3, що включає послідовність SEQ ID 55 NO:33.

У варіантах реалізації, варіабельна ділянка важкого ланцюга включає послідовність, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну з SEQ ID NO:17. У варіантах реалізації, варіабельна ділянка важкого ланцюга складається з послідовності, яка принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентична з SEQ ID NO:17 або відрізняється від SEQ ID 60 NO:17 не більш ніж на 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислоту. У варіантах реалізації, варіабельна ділянка

важкого ланцюга відрізняється від SEQ ID NO:17 не більш ніж на 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислоту. У варіантах реалізації, варіабельна ділянка важкого ланцюга відрізняється від SEQ ID NO:17 на 1-5 амінокислот.

У варіантах реалізації, варіабельна ділянка важкого ланцюга включає послідовність, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну SEQ ID NO:37. У варіантах реалізації, варіабельна ділянка важкого ланцюга складається з послідовності, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичної SEQ ID NO:37. У варіантах реалізації, варіабельна ділянка важкого ланцюга відрізняється від SEQ ID NO:37 не більш ніж на 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислоту. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:37. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, що складається з SEQ ID NO:37.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну SEQ ID NO:39. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність, яка відрізняється від SEQ ID NO:39 не більш ніж на 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислоту. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає SEQ ID NO:39. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є Fab.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну SEQ ID NO:54. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність, яка відрізняється від SEQ ID NO:54 не більш ніж на 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислоту. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає SEQ ID NO:54. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є Fab.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є scFv. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий (фрагмент) включає або складається з послідовності scFv

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTTTPGGGTINYYAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPYLYYALEYWGGQTTVTVSSGGGGSGG
GGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMNWWYQQKPGQPPKLLIYAASNR
GSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGGTKLEIKRTV (SEQ ID NO:52)
або

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMNWWYQQKPGQPPKLLIYAASNRGSGVPDR
FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGGTKLEIKRTVGGGGSGGGGSGGGGSQV
QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTTTPGGGTINYYAQKFGGR
VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPYLYYALEYWGGQTTVTVSS (SEQ ID NO:53).

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну SEQ ID NO:52 або SEQ ID NO:53. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає SEQ ID NO:52 або SEQ ID NO:53. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є scFv.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність важкого ланцюга, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну SEQ ID NO:41. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність важкого ланцюга, яка відрізняється від SEQ ID NO:41 не більш ніж на 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислоту. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить послідовність важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:41. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність важкого ланцюга, що складається з SEQ ID NO:41.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до людського IL-6 і/або підвищену ефективність порівняно з EBI-029 або його фрагментом. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до людського IL-6 і/або підвищену ефективність у порівнянні з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, який містить VH CDR1, що включає послідовність SEQ ID NO:4, VH CDR2, що включає послідовність SEQ ID NO:5, та необов'язково VH CDR3, що включає послідовність SEQ ID NO:6. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до людського IL-6 і/або підвищену ефективність у порівнянні з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, який містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка включає або складається з SEQ ID NO:17. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до людського IL-6 і/або підвищену ефективність у порівнянні з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, який містить SEQ ID

NO:24. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до людського IL-6 та/або підвищену ефективність у порівнянні з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, який містить послідовність важкого ланцюга, що включає або складається з SEQ ID NO:11.

- 5 У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає одну чи декілька послідовностей EBI-030 або EBI-031, наведених у Таблиці 4. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить один чи декілька доменів EBI-030 або EBI-031, представлених на Фіг. 15 (наприклад, один чи декілька з FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, CH1, шарнірного, CH2 та CH3 послідовності важкого ланцюга, і/або FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 та СК послідовності легкого ланцюга). У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає важкий ланцюг та легкий ланцюг. У варіантах реалізації, важкий та легкий ланцюги з'єднані одним чи декількома дисульфідними зв'язками. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є Fab. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є scFv. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є фрагментом Fab, Fab', F(ab')₂, scFv або Fv.

- 15 У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до людського IL-6 і/або підвищену ефективність у порівнянні з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, які містять одну чи декілька відповідних послідовностей EBI-029, або послідовностей антитіла, описаного у WO2014/074905, який цим включений до даного документу шляхом посилання в повному обсязі. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до людського IL-6 і/або підвищену ефективність порівняно з тоцилізумабом.

Таблиця 4

Загальний опис послідовностей EBI-029, EBI-030 та EBI-031

Опис	SEQ ID NO:	Послідовність
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-029 HC (IgG2)	SEQ ID NO:11	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS <u>NYLIEWVRQA</u> PGQGLEWMGV <u>ITPGSGTINY</u> AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR <u>WDPLYYYALE</u> YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
EBI-029 HC – H311A	SEQ ID NO:10	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS <u>NYLIEWVRQA</u> PGQGLEWMGV <u>ITPGSGTINY</u> AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR <u>WDPLYYYALE</u> YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV <u>AQDWLNGKEY</u> KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-029 LC	SEQ ID NO:12	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD <u>NYGIPFMNWWY</u> QQKPGQPPKL LIYAASNRRGS <u>GVPDRFSGSG</u> SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY <u>YCQQSEEVPL</u> IFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTAASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

Загальний опис послідовностей EBI-029, EBI-030 та EBI-031

Опис	SEQ ID NO:	Послідовність
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-029 (IgG1) Fab HC	SEQ ID NO:24	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS <u>NYLIEWVRQA</u> PGQGLEWMGV <u>ITPGSGTINY</u> AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR <u>WDPLYYYALE</u> YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-029 VH	SEQ ID NO:17	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYALS <u>SNYLIE</u> WVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTINYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS <u>SRWDPLYYYALEY</u> WGQGTITVTVSS
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-029 VL	SEQ ID NO:18	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMNWWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV
EBI-029 HC CDR1	SEQ ID NO:4	GYALSNYLIE
EBI-029 HC CDR2	SEQ ID NO:5	VITPGSGTIN
EBI-029 HC CDR3	SEQ ID NO:6	SRWDPLYYYALEY
EBI-029 LC CDR1	SEQ ID NO:7	RASESDNYGIPFMN
EBI-029 LC CDR2	SEQ ID NO:8	AASNRRGS
EBI-029 LC CDR3	SEQ ID NO:9	QQSEEVPLT
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-030 HC (IgG2)	SEQ ID NO:41	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP <u>NYLIEWVRQA</u> PGQGLEWMGV <u>VITPGGGTINY</u> AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARS <u>SRWDPLYYYALE</u> YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-030 LC	SEQ ID NO:42	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESD <u>NYGIPFMNWWY</u> QQKPGQPPKL LIYAASNRRGS <u>GVPDRFSGSG</u> SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPLTFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-030 (IgG1) Fab HC	SEQ ID NO:39	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP <u>NYLIEWVRQA</u> PGQGLEWMGV <u>VITPGGGTINY</u> AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR <u>WDPLYYYALE</u> YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-030 (IgG2) Fab HC	SEQ ID NO:54	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYVLPNYLIEWVRQAPG QGLEWMGVITPGGGTINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYYALEYWGQGTITVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPS NTKVDKTVRK

Загальний опис послідовностей EBI-029, EBI-030 та EBI-031

Опис	SEQ ID NO:	Послідовність
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-030 VH	SEQ ID NO:37	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTVSS
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-030 VL	SEQ ID NO:38	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMNWWYQQK PGQPPKLLIYAASNRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV
EBI-030 HC CDR1	SEQ ID NO:31	GYVLPNYLIE
EBI-030 HC CDR2	SEQ ID NO:32	VITPGGGTIN
EBI-030- HC CDR3	SEQ ID NO:33	SRWDPLYYYALEY
EBI-030 LC CDR1	SEQ ID NO:34	RASESDNYGIPFMN
EBI-030 LC CDR2	SEQ ID NO:35	AASNRGS
EBI-030 LC CDR3	SEQ ID NO:36	QQSEEVPLT
Амінокис-лотна послідов-ність EBI-031 IgG2 HC	SEQ ID NO:47	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNV DHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTIVV AQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
Амінокис-лотна послідов-ність scFv VH-VL	SEQ ID NO:52	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYVLPNYLIEWVRQAPG QGLEWMGVTTTPGGGTINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARSRWDPPLYYYALEYWGQGTITVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESD NYGIPFMNWWYQQKPGQPPKLLIYAASNRGSGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV
Амінокис-лотна послідов-ність scFv VL-VH	SEQ ID NO:53	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMNWWYQQK PGQPPKLLIYAASNRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTVGGGGSGGGGSGGG GSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYVLPNYLIEWVRQA PGQGLEWMGVTTTPGGGTINYAQKFQGRVTITADESTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARSRWDPPLYYYALEYWGQGTITVTVSS

aa=амінокислота; па=нуклеїнова кислота; HC=важкий ланцюг; LC=легкий ланцюг; VH=варіабельна ділянка важкого ланцюга; VL=варіабельна ділянка легкого ланцюга

Підвищену афінність і/або підвищену ефективність можна оцінити з використанням способів, описаних в даному документі, і/або способів, відомих фахівцям.

У варіантах реалізації, афінність оцінюють з використанням поверхневого плазмонного резонансу (ППР).

У варіантах реалізації, афінність підвищується принаймні у 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3 або 4 рази.

У варіантах реалізації, ефективність підвищується. У варіантах реалізації, ефективність підвищується, про що свідчить зниження IC50 і/або зниження IC90. У варіантах реалізації, IC50

знижується принаймні у 5, 10, 20, 30, 40 або 50 разів. У варіантах реалізації, IC50 знижується принаймні у приблизно 50 разів. У варіантах реалізації, IC90 знижується принаймні у 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 або 500 разів. У варіантах реалізації, IC90 знижується принаймні у приблизно 100 разів.

5 У варіантах реалізації, ефективність оцінюють, наприклад, за допомогою аналізу HEK-Blue™ або аналізу проліферації T1165.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент інгібує цис-сигналінг IL-6, наприклад, за результатами оцінки на основі значення IC50 або IC90, одержаного з використанням аналізу HEK-Blue™, описаного в даному документі, наприклад, з 20 пМ вільного IL-6.

10 У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має IC50 менше 47 пМ і/або IC90 менш ніж 4350 пМ. У варіантах реалізації, IC50 є меншим ніж 47 пМ, наприклад, меншим ніж 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 або 1 пМ. У варіантах реалізації, IC90 є меншим ніж 4350 пМ, наприклад, меншим ніж 4000, 2000, 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10 або 5 пМ. У варіантах реалізації, IC50 та/або IC90 оцінюють шляхом проведення аналізу HEK-Blue™ з 20 пМ IL-6.

15 У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент блокує вільний IL-6 з більшою ефективністю, ніж тоцилізумаб, наприклад, за результатами оцінки на основі значень IC50, одержаних з використанням аналізу HEK-Blue™ з 20 пМ IL-6. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент інгібує IL-6 з ефективністю, що перевищує ефективність тоцилізумабу у більш ніж 900 разів. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є EBI-031 або його антигензв'язуючим фрагментом. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має IC50 менше 15 пМ, наприклад, IC50 становить 14,2 пМ, при інгібуванні IL-6.

20 У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент блокує транс-сигналінг IL-6, наприклад, за результатами аналізу методом HEK-Blue™, описаним в даному документі, наприклад, з 200 пМ гіпер-IL-6 (hyper-IL-6). У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент інгібує сигналінг гіпер-IL-6. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент інгібує сигналінг гіпер-IL-6 з більшою ефективністю, ніж тоцилізумаб, наприклад, з ефективністю, що перевищує тоцилізумаб у більш ніж 900 разів. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент інгібує сигналінг гіпер-IL-6 з величиною IC50 менше 1 мкМ. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент інгібує сигналінг гіпер-IL-6 з величиною IC50 менше 1 нМ. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент інгібує сигналінг гіпер-IL-6 з величиною IC50 менше 100 пМ або менше 50 пМ, наприклад, з IC50 приблизно 14-15 пМ. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є EBI-031 або його антигензв'язуючим фрагментом.

25 У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент блокує транс-сигналінг IL-6 та транс-сигналінг IL-6.

30 У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент ефективно блокує сигналінг IL-6 в оці протягом щонайменше 1 місяця, 2 місяців, 3 місяців, 4 місяців, 5 місяців, або 6 місяців, наприклад, після інтравітреального введення. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент блокує 95 % сигналінгу IL-6 в оці протягом щонайменше 1 місяця, 2 місяців, 3 місяців, 4 місяців, 5 місяців, або 6 місяців, наприклад, після інтравітреального введення. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент блокує 95 % сигналінгу IL-6 в оці протягом приблизно 150 днів.

35 В іншому аспекті, запропонованому в даному винаході, виділяють антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, що містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну SEQ ID NO:37, де зазначена послідовність важкого ланцюга включає одну чи декілька (наприклад, 1, 2, 3 або 4) амінокислот, вибраних з V28, P30, T51 та G55 (нумерація амінокислот згідно із SEQ ID NO:41).

40 В додатковому аспекті, запропонованому в даному документі, виділяють антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, що містить послідовність, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну SEQ ID NO:39, де зазначена послідовність містить одну чи декілька (наприклад, 1, 2, 3 або 4) амінокислот, вибраних з V28, P30, T51 та G55 (нумерація амінокислот згідно із SEQ ID NO:41).

45 В додатковому аспекті, запропонованому в даному документі виділяють антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, що містить послідовність, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну SEQ ID NO:54, де зазначена послідовність містить одну чи декілька (наприклад, 1, 2, 3 або 4) амінокислот, вибраних з V28, P30, T51 та G55 (нумерація амінокислот згідно із SEQ ID NO:41).

50 Також в даному документі передбачається виділене антитіло або антигензв'язуючий

фрагмент, що містить послідовність важкого ланцюга, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну SEQ ID NO:41, де зазначена послідовність важкого ланцюга включає одну чи декілька (наприклад, 1, 2, 3 або 4) амінокислот, вибраних з V28, P30, T51 та G55 (нумерація амінокислот згідно із SEQ ID NO:41).

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до людського IL-6 порівняно з контрольним антитілом, наприклад, порівняно з EBI-029 або його фрагментом. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену афінність до людського IL-6 порівняно з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, які в інших відношеннях є ідентичними, за винятком того, що не містять зазначені одну чи декілька амінокислот, вибраних з V28, P30, T51 та G55, і замість цього містять одну чи декілька (наприклад, 1, 2, 3 або 4) амінокислот, вибраних з A28, S30, I51 та S55. У варіантах реалізації, афінність підвищується принаймні в 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3 або 4 рази. У варіантах реалізації, афінність оцінюють з використанням поверхневого плазмонного резонансу (ППР).

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену ефективність порівняно з контрольним антитілом, наприклад, порівняно з EBI-029 або його фрагментом. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має підвищену ефективність порівняно з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, які в інших відношеннях є ідентичними, за винятком того, що не містять зазначені одну чи декілька амінокислот, вибраних з V28, P30, T51 та G55, і замість цього містять одну чи декілька (наприклад, 1, 2, 3 або 4) амінокислот, вибраних з A28, S30, I51 та S55.

У варіантах реалізації, ефективність підвищується, про що свідчить зниження IC50 і/або зниження IC90. У варіантах реалізації, IC50 знижується принаймні у 5, 10, 20, 30, 40 або 50 разів. У варіантах реалізації, IC50 знижується принаймні у приблизно 50 разів. У варіантах реалізації, IC90 знижується принаймні у 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 або 500 разів. У варіантах реалізації, IC90 знижується принаймні у приблизно 100 разів.

У варіантах реалізації, ефективність оцінюють з використанням аналізу HEK-Blue™ або аналізу проліферації T1165.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має IC50 менше 47 пМ та/або IC90 менш ніж 4350 пМ. У варіантах реалізації, IC50 є меншим ніж 47 пМ, наприклад, меншим ніж 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 або 1 пМ. У варіантах реалізації, IC90 є меншим ніж 4350 пМ, наприклад, меншим ніж 4000, 2000, 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10 або 5 пМ. У варіантах реалізації, IC50 та/або IC90 оцінюють шляхом проведення аналізу HEK-Blue™ з 20 пМ IL-6.

В деяких варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить V28, P30, T51 та G55, і антитіло або антигензв'язуючий фрагмент демонструє покращену афінність по відношенню до людського IL-6 і/або покращену ефективність у порівнянні з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, які в інших відношеннях є ідентичними, за винятком того, що містять A28, S30, I51 та S55.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, описаний в даному документі, додатково включає варіабельну ділянку легкого ланцюга або її антигензв'язуючий фрагмент, включаючи VL CDR1, VL CDR2, і VL CDR3.

У варіантах реалізації, VL CDR1 включає послідовність SEQ ID NO:34, VL CDR2 включає послідовність SEQ ID NO:35, і VL CDR3 включає послідовність SEQ ID NO:36.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент додатково містить послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну SEQ ID NO:38.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент додатково містить послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO:38 або яка відрізняється від SEQ ID NO:38 не більш ніж на 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислоту.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент додатково містить послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO:38. У варіантах реалізації, послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга складається з SEQ ID NO:38.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент додатково містить послідовність легкого ланцюга, принаймні на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичну SEQ ID NO:42.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент додатково містить послідовність легкого ланцюга, яка відрізняється не більш ніж на 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислоту від SEQ ID NO:42.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент додатково містить послідовність легкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO:42.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент додатково містить

послідовність легкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO:42 або послідовність, яка відрізняється не більш ніж на 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислоту від SEQ ID NO:42. У варіантах реалізації, послідовність легкого ланцюга складається з SEQ ID NO:42.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить (i) VH CDR1, що включає послідовність SEQ ID NO:31, VH CDR2, що включає послідовність SEQ ID NO:32, і VH CDR3, що включає послідовність SEQ ID NO:33, та (ii) VL CDR1, що включає послідовність SEQ ID NO:34, VL CDR1, що включає послідовність SEQ ID NO:35, і VL CDR3, що включає послідовність SEQ ID NO:36. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить вищезазначені CDR, за винятком того, що він має мутацію, наприклад, загалом, не більше 1, 2 або 3 мутацій в усіх шести CDR. У варіантах реалізації, мутація (мутації) не знижують афінність і/або ефективність антитіла або антигензв'язуючого фрагмента.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є антитілом IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 або його фрагментом. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є антитілом IgG1 або IgG2 або його фрагментом. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є IgG1 Fab або IgG2 Fab. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є антитілом або антигензв'язуючим фрагментом IgG2.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є генетично модифікованим з метою зниження або усунення активності ADCC.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є моноклональним антитілом або його антигензв'язуючим фрагментом. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є гуманізованим або людським моноклональним антитілом або його антигензв'язуючим фрагментом.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає або складається з SEQ ID NO:37, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає або складається з SEQ ID NO:38. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить вищевказані варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів, за винятком того, що воно має мутацію, наприклад, загалом не більш ніж 1, 2 або 3 мутації. У варіантах реалізації, мутація (мутації) не знижують афінність і/або ефективність антитіла або антигензв'язуючого фрагмента.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить послідовність важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:41 та, необов'язково, послідовність легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:42.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність важкого ланцюга, що складається з SEQ ID NO:41 та, необов'язково, послідовність легкого ланцюга, що складається з SEQ ID NO:42.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить послідовність важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:47 та, необов'язково, послідовність легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO:42.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність важкого ланцюга, ідентичну SEQ ID NO:41, та послідовність легкого ланцюга, ідентичну SEQ ID NO:42, за винятком того, що антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить мутацію (наприклад, загалом 1, 2, 3, 4 або 5 мутацій у порівнянні з SEQ ID NO:41 та/або SEQ ID NO:42). У варіантах реалізації, мутація (мутації) розташована у каркасній ділянці (ділянках). У варіантах реалізації, мутація не знижує афінність та/або ефективність антитіла або антигензв'язуючого фрагмента порівняно з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, що не містить зазначеної мутації.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність важкого ланцюга, ідентичну SEQ ID NO:47, та послідовність легкого ланцюга, ідентичну SEQ ID NO:42, за винятком того, що антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить мутацію (наприклад, загалом 1, 2, 3, 4 або 5 мутацій у порівнянні з SEQ ID NO:47 і/або SEQ ID NO:42). У варіантах реалізації, мутація (мутації) розташована у каркасній ділянці (ділянках). У варіантах реалізації, мутація не знижує афінність і/або ефективність антитіла або антигензв'язуючого фрагмента порівняно з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, що не містить зазначеної мутації.

В одному варіанті реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є Fab.

В одному варіанті реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є Fab IgG1.

В одному варіанті реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є виділеним Fab, що містить послідовність важкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO:39, та послідовність легкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO:42. В одному варіанті реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є виділеним Fab, що містить послідовність важкого ланцюга, що

складається з SEQ ID NO:39, та послідовність легкого ланцюга, що складається з SEQ ID NO:42.

В одному варіанті реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є Fab IgG2.

В одному варіанті реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є виділеним Fab, що містить послідовність важкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO:54, та послідовність легкого ланцюга, яка включає SEQ ID NO:42. В одному варіанті реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є виділеним Fab, що містить послідовність важкого ланцюга, яка складається з SEQ ID NO:54, та послідовність легкого ланцюга, яка складається з SEQ ID NO:42.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність важкого ланцюга, ідентичну SEQ ID NO:39, та послідовність легкого ланцюга, ідентичну SEQ ID NO:42, за винятком того, що антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить мутацію (наприклад, загалом 1, 2, 3, 4 або 5 мутацій у порівнянні з SEQ ID NO:39 і/або SEQ ID NO:42). У варіантах реалізації, мутація (мутації) розташована у каркасній ділянці (ділянках). У варіантах реалізації, мутація не знижує афінність і/або ефективність антитіла або антигензв'язуючого фрагмента порівняно з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, що не містить зазначеної мутації.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент включає послідовність важкого ланцюга, ідентичну SEQ ID NO:54, та послідовність легкого ланцюга, ідентичну SEQ ID NO:42, за винятком того, що антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить мутацію (наприклад, загалом 1, 2, 3, 4 або 5 мутацій у порівнянні з SEQ ID NO:54 та/або SEQ ID NO:42). У варіантах реалізації, мутація (мутації) розташована у каркасній ділянці (ділянках). У варіантах реалізації, мутація не знижує афінність та/або ефективність антитіла або антигензв'язуючого фрагмента порівняно з антитілом або антигензв'язуючим фрагментом, що не містить зазначеної мутації.

В деяких варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент можуть зв'язуватися щонайменше з одним із R24, K27, Y31, D34, S118 або V121 людського IL-6. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент можуть зв'язуватися to R24, K27, Y31, D34, S118 та V121 людського IL-6. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент можуть зв'язуватися з щонайменше 1, щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, або щонайменше 5 із R24, K27, Y31, D34, S118 та V121 людського IL-6.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент можуть зв'язуватися (наприклад, можуть специфічно зв'язуватися) із сайтом II людського IL-6.

У варіантах реалізації, антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент може зв'язуватися з IL-6 з T_m 70 °C чи вище.

У варіантах реалізації, антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент може зв'язуватися з IL-6 з T_m 80 °C чи вище.

У варіантах реалізації, антитіло або його фрагмент (наприклад, його антигензв'язуючий фрагмент) зв'язується із щонайменше одним з R24, K27, Y31, D34, S118 та V121 людського IL-6.

У варіантах реалізації, антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язується із щонайменше двома з R24, K27, Y31, D34, S118 та V121 людського IL-6. У варіантах реалізації, антитіло (або) його антигензв'язуючий фрагмент зв'язується із щонайменше трьома з R24, K27, Y31, D34, S118 та V121 людського IL-6. У варіантах реалізації, антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язується із щонайменше чотирма з R24, K27, Y31, D34, S118 та V121 людського IL-6. У варіантах реалізації, антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язується із щонайменше п'ятьма з R24, K27, Y31, D34, S118 та V121 людського IL-6. У варіантах реалізації, антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент зв'язується з R24, K27, Y31, D34, S118 та V121 людського IL-6.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є моноклональним антитілом або його антигензв'язуючим фрагментом. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент є гуманізованим моноклональним антитілом. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент (є) людським моноклональним антитілом.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент демонструє <10 % агрегації при концентрації 100-150 мг/мл, наприклад, при концентрації близько 142 мг/мл, у фосфатно-сольовому буфері (PBS), pH 7,4. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має удосконалені фармакокінетичні властивості порівняно з іншим терапевтичним агентом, наприклад, порівняно з тоцилізумабом, бевацизумабом, ранібізумабом і/або Ейлеа (Eylea®). У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має покращене утримування в оці при введенні в око, наприклад, інтравітреально, наприклад, шляхом інтравітреальної ін'єкції. У варіантах реалізації, про покращене утримування в оці

свідчить збільшений період напіввиведення в оці, наприклад, у склистому тілі, сітківці, водянистій волозі, судинній оболонці і/або склері.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент має період напіввиведення у склистому тілі щонайменше 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 днів. У варіантах реалізації, період напіввиведення у склистому тілі становить щонайменше 10 днів. У варіантах реалізації, період напіввиведення (the half) у склистому тілі оцінюють у тварини, наприклад, у кроля або мавпи. У варіантах реалізації, період напіввиведення у склистому тілі оцінюють у людини.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, описаний в даному документі, має зменшений системний період напіввиведення (наприклад, меншу величину $T_{1/2\beta}$) і/або покращений системний кліренс, наприклад, зменшений системний період напіввиведення або прискорений системний кліренс порівняно з показниками для іншого терапевтичного агента, наприклад, тоцилізумабу, бевацизумабу, ранібізумабу та/або афліберцепту (Eylea®). У варіантах реалізації, системний період напіввиведення (наприклад, $T_{1/2\beta}$) є меншим, ніж у тоцилізумабу та/або афліберцепту (Eylea®). У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить Fc-домен, що включає мутацію (наприклад, 1, 2, 3 або 4 мутації) в одному чи декількох положеннях, що відповідають H311, D313, I254 або H436 (нумерація як у SEQ ID NO:41). У варіантах реалізації, мутацію вибирають з однієї чи декількох з H311A, H311E, H311N, D313T, I254A, I254R та H436A. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент містить Fc-домен, що включає мутацію, яка відповідає H311A (нумерація як у SEQ ID NO:41). У варіантах реалізації, Fc-домен є Fc-доменом IgG1. У варіантах реалізації, Fc-домен є Fc-доменом IgG2.

У варіантах реалізації, Fc-домен є Fc-доменом людського IgG1, що має послідовність SEQ ID NO:50 та необов'язково включає мутацію в одному чи декількох з підкреслених положень: (H90, D92, I33 та H215):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:50).

У варіантах реалізації, Fc-домен IgG1 включає мутацію, що відповідає одному чи декільком з H90A, H90E, H90N, D92T, I33A, I33R та H215A (нумерація згідно з SEQ ID NO:50).

У варіантах реалізації, Fc-домен є Fc-доменом людського IgG2, що має послідовність SEQ ID NO:51 та необов'язково включає мутацію в одному чи декількох з підкреслених положень (H86, D88, I29 та H211):

VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:51).

У варіантах реалізації, Fc-домен IgG2 включає мутацію, що відповідає одному чи декільком з H86A, H86E, H86N, D88T, I29A, I29R та H211A (нумерація згідно з SEQ ID NO:51).

У варіантах реалізації, мутація Fc зменшує системне накопичення антитіла або антигензв'язуючого фрагмента (наприклад, підвищує кліренс або знижує період напіввиведення, наприклад, $T_{1/2\beta}$) антитіла або антигензв'язуючого фрагмента. У варіантах реалізації, системне накопичення зменшується порівняно з показниками для іншого терапевтичного агента (наприклад, тоцилізумабу, бевацизумабу, ранібізумабу і/або афліберцепту). У варіантах реалізації, системне накопичення зменшується порівняно з тоцилізумабом і/або афліберцептом. У варіантах реалізації, системне накопичення зменшується порівняно з системним накопиченням відповідного антитіла або антигензв'язуючого фрагмента, що не містить мутації. У варіантах реалізації, системне накопичення оцінюють після інтравітреального введення антитіла або антигензв'язуючого фрагмента.

В іншому аспекті, даний винахід пропонує спосіб зменшення системних ефектів інгібування IL-6 у суб'єкта, який включає введення суб'єкту антитіла або його фрагмента, що містить мутований Fc-домен, як описано в даному документі. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент може інгібувати активність IL-6 та має знижену Fc-активність (наприклад, знижене зв'язування з FcRn) у порівнянні з відповідним антитілом або його фрагментом, що має Fc-домен дикого типу. В деяких випадках, спосіб зменшення системних ефектів інгібування IL-6 у суб'єкта включає введення суб'єкту антагоніст IL-6, що включає мутований Fc-домен, як описано в даному документі.

В додатковому аспекті, в даному документі пропонується нуклеїнова кислота, яка включає послідовність, що кодує антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, описаний в даному

документі. У варіантах реалізації, нуклеїнова кислота кодує амінокислотну послідовність, розкриту в даному документі. У варіантах реалізації, нуклеїнова кислота включає SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:43 або SEQ ID NO:48. У варіантах реалізації, нуклеїнова кислота кодує послідовність, розкриту в Таблиці 4.

Також в даному документі передбачається вектор, який містить нуклеїнову кислоту. Також в даному документі пропонується клітина, яка включає нуклеїнову кислоту або вектор.

У варіантах реалізації, антитіло IL-6 або антигензв'язуючий фрагмент, описаний в даному документі, призначені для застосування у лікуванні суб'єкта (наприклад, людини) з хворобою, асоційованою з IL-6. У варіантах реалізації, хвороба є очною хворобою, наприклад, очною хворобою, яка характеризується підвищеним рівнем IL-6, наприклад, у склистому тілі.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент призначені для застосування у лікуванні суб'єкта (наприклад, людини) з діабетичним макулярним набряком (ДМН), діабетичною ретинопатією, увеїтом, глаукомою, сухими очами (наприклад, хворобою сухих очей або сухим кератокон'юнктивітом), алергічним кон'юнктивітом, очним болем, регматогенним відшаруванням сітківки (РВС), віковою макулярною дегенерацією (ВМД), проліферативною діабетичною ретинопатією (ПДР), оклюзії вен сітківки (ОВС), нейромієлітом зорового нерва (НЗН), пересадженням рогівки, подряпиною рогівки, або фізичним ушкодженням ока. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент призначені для застосування у лікуванні суб'єкта (наприклад, людини) з ДМН.

У варіантах реалізації, антитіло IL-6 або антигензв'язуючий фрагмент, описані в даному документі, призначені для застосування у виготовленні лікарського засобу для лікування хвороби, асоційованої з IL-6. У варіантах реалізації, хвороба є очною хворобою, наприклад, очною хворобою, яка характеризується підвищеним рівнем IL-6 у склистому тілі. У варіантах реалізації, хвороба, асоційована з IL-6, є діабетичним макулярним набряком (ДМН), діабетичною ретинопатією, увеїтом, сухими очами (наприклад, хворобою сухих очей або сухим кератокон'юнктивітом), віковою макулярною дегенерацією (ВМД), проліферативною діабетичною ретинопатією (ПДР), регматогенним відшаруванням сітківки (РВС), оклюзією вен сітківки (ОВС), нейромієлітом зорового нерва (НЗН), пересадженням рогівки, подряпиною рогівки, або фізичним ушкодженням ока. У варіантах реалізації, хвороба, асоційована з IL-6, є діабетичним макулярним набряком. У варіантах реалізації, лікарський засіб складається для доставки у склисте тіло ока суб'єкта (наприклад, для інтравітреальної ін'єкції).

Також в даному документі передбачається композиція, що містить антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, описаний в даному документі. У варіантах реалізації, композиція додатково містить фармацевтично прийнятний носій та один чи декілька фармацевтично прийнятних ексципієнтів.

У варіантах реалізації, композиція призначена для застосування у лікуванні хвороби, асоційованої з IL-6. У варіантах реалізації, хвороба є очною хворобою, наприклад, очною хворобою, яка характеризується підвищеним рівнем IL-6 у склистому тілі. У варіантах реалізації, композиція призначена для застосування у лікуванні діабетичного макулярного набряку (ДМН), діабетичної ретинопатії, увеїту, сухих очей (наприклад, хвороби сухих очей або сухого кератокон'юнктивіту), вікової макулярної дегенерації (ВМД), проліферативної діабетичної ретинопатії (ПДР), регматогенного відшарування сітківки (РВС), оклюзії вен сітківки (ОВС), нейромієліту зорового нерва (НЗН), пересадження рогівки, подряпини рогівки, або фізичного ушкодження ока.

Також в даному документі передбачається спосіб лікування хвороби, асоційованої з IL-6, який включає введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості антитіла IL-6 або фрагмента, описаних в даному документі. У варіантах реалізації, хвороба, асоційована з IL-6, є очною хворобою, наприклад, очною хворобою, яка характеризується підвищеним рівнем IL-6 у склистому тілі. У варіантах реалізації, хвороба, асоційована з IL-6, є діабетичним макулярним набряком (ДМН), діабетичною ретинопатією, увеїтом, сухими очами (наприклад, хворобою сухих очей або сухим кератокон'юнктивітом), віковою макулярною дегенерацією (ВМД), проліферативною діабетичною ретинопатією (ПДР), регматогенним відшаруванням сітківки (РВС), оклюзією вен сітківки (ОВС), нейромієлітом зорового нерва (НЗН), пересадженням рогівки, подряпиною рогівки, або фізичним ушкодженням ока. У варіантах реалізації, хвороба, асоційована з IL-6, є діабетичним макулярним набряком.

У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, або композиція, що містить антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, доставляється у склисте тіло ока суб'єкта (наприклад, шляхом інтравітреальної ін'єкції). У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, або композиція, що містить антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, призначені для інтравітреальної ін'єкції.

У варіантах реалізації, хвороба, асоційована з IL-6, є діабетичним макулярним набряком, і антитіло або фрагмент, або композиція, що містить антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, доставляється у склисте тіло ока суб'єкта.

Також в даному документі передбачається антитіло або його фрагмент (наприклад, антигензв'язуючий фрагмент) (наприклад, антитіло IL-6 або його фрагмент, як описано в даному документі), або композиція, що містить таке антитіло або його фрагмент, для застосування у лікуванні хвороби, асоційованої з IL-6 (наприклад, для застосування у лікуванні суб'єкта, наприклад, людини, що має хворобу, асоційовану з IL-6).

У варіантах реалізації, зазначена хвороба є очною хворобою, яка характеризується підвищеним рівнем IL-6, наприклад, у склистому тілі. У варіантах реалізації, зазначена хвороба є діабетичним макулярним набряком (ДМН), діабетичною ретинопатією, увеїтом, сухими очима (наприклад, розладом сухих очей або хворобою сухих очей), алергічним кон'юнктивітом, віковою макулярною дегенерацією (ВМД), проліферативною діабетичною ретинопатією (ПДР), регматогенним відшаруванням сітківки (РВС), оклюзією вен сітківки (ОВС), нейромієлітом зорового нерва (НЗН), пересадженням рогівки, подряпиною рогівки, або фізичним ушкодженням ока. У варіантах реалізації, зазначена хвороба є ДМН. У варіантах реалізації, зазначена хвороба є хворобою сухих очей. У варіантах реалізації, зазначена хвороба є сухим кератокон'юнктивітом. У варіантах реалізації, зазначена хвороба є увеїтом. У варіантах реалізації, зазначена хвороба є ВМД. У варіантах реалізації, зазначена хвороба є ПДР. У варіантах реалізації, зазначена хвороба є пересадженням рогівки, подряпиною рогівки, або фізичним ушкодженням ока. У варіантах реалізації, антитіло або його фрагмент (наприклад, антигензв'язуючий фрагмент) є придатними для доставки у склисте тіло ока. У варіантах реалізації, антитіло або його фрагмент (наприклад, антигензв'язуючий фрагмент) доставляється у склисте тіло ока.

Також в даному документі передбачається спосіб лікування хвороби, асоційованої з IL-6, який включає введення суб'єкту антитіла IL-6 або його фрагмента (наприклад, його антигензв'язуючого фрагмента), наприклад, антитіла IL-6 або його фрагмента, як описано в даному документі. У варіантах реалізації, антитіло IL-6 або його фрагмент (наприклад, його антигензв'язуючий фрагмент), вводять в терапевтично ефективній кількості. У варіантах реалізації, хвороба, асоційована з IL-6, є очною хворобою, яка характеризується підвищеним рівнем IL-6 у склистому тілі. У варіантах реалізації, хвороба, асоційована з IL-6, є діабетичним макулярним набряком (ДМН), діабетичною ретинопатією, увеїтом, сухим кератокон'юнктивітом, хворобою сухих очей, віковою макулярною дегенерацією (ВМД), проліферативною діабетичною ретинопатією (ПДР), оклюзією вен сітківки (ОВС), нейромієлітом зорового нерва (НЗН), пересадженням рогівки, подряпиною рогівки, або фізичним ушкодженням ока.

У варіантах реалізації, антитіло або його фрагмент (наприклад, його антигензв'язуючий фрагмент), є придатними для доставки у склисте тіло ока. У варіантах реалізації, антитіло або його фрагмент (наприклад, його антигензв'язуючий фрагмент), доставляється у склисте тіло ока суб'єкта. У варіантах реалізації, хвороба, асоційована з IL-6, є діабетичним макулярним набряком, і антитіло або його фрагмент доставляється у склисте тіло ока суб'єкта.

Також в даному документі передбачається набір, що містить антитіло IL-6 або композицію, розкриті в даному документі, та, необов'язково, інструкції із застосування.

Також в даному документі передбачається контейнер або пристрій, наприклад, пристрій для доставки ліків, що містять антитіло IL-6 або композицію, розкриті в даному документі. У варіантах реалізації, зазначений пристрій призначений для доставки антитіла або композиції в око, наприклад, в склисте тіло. Також в даному документі пропонується набір, який включає зазначений контейнер або пристрій.

У використовуваному в даному документі значенні, термін "антитіло" є синонімічним з імуноглобуліном і повинен мати значення, загальновідоме в цій галузі техніки. Термін антитіло не обмежений будь-яким конкретним способом одержання антитіла. Наприклад, термін антитіло включає, серед іншого, рекомбінантні антитіла, моноклональні антитіла та поліклональні антитіла. У використовуваному в даному документі значенні, антитіло є тетрамером і, якщо не зазначено інше, складається кожне з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, причому кожна пара включає один легкий ланцюг та один важкий ланцюг. Амінотермінальний кінець кожного ланцюга включає варіабельну ділянку з приблизно 100-120 чи більше амінокислот, яка відіграє основну роль у розпізнаванні антигену. Карбокситермінальна ділянка кожного ланцюга включає константну область, що має основну роль в ефекторній функції антитіла. Класи легких ланцюгів людини називаються каппа- та лямбда-легкими ланцюгами. Класами важких ланцюгів є мю, дельта, гамма, альфа або епсілон, які визначають ізотип антитіла. Ізотипами антитіл є IgM, IgD, IgG, IgA та IgE, відповідно. У легких та важких ланцюгах, варіабельні та константні

області з'єднані за допомогою ділянки "J", що складається з приблизно 12 чи більше амінокислот, причому важкий ланцюг також включає ділянку "D", що складається з приблизно трьох чи більше амінокислот.

5 Варіабельні ділянки кожної пари важкого/легкого ланцюгів (VH та VL), відповідно, утворюють антигензв'язуючий сайт. Відповідно, інтактне антитіло IgG, наприклад, має два зв'язуючих сайти. За винятком біфункціональних або біспецифічних антитіл, два зв'язуючі сайти є однаковими.

10 Варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів антитіла демонструють однакову загальну структуру відносно консервативних каркасних ділянок (FR), з'єднаних трьома гіперваріабельними ділянками, які також називаються ділянками, що визначають комплементарність, або CDR. Термін "варіабельний" стосується того факту, що певні частини варіабельних доменів істотно відрізняються за послідовностями у різних антитіл та задіяні у зв'язуванні та специфічності кожного конкретного антитіла до його конкретного антигену. Варіабельність визначають переважно CDR, які розділені більш висококонсервативними

15 каркасними ділянками (FR). Віднесення амінокислот до кожного домену роблять відповідно до визначень, наведених у Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 та 1991)), або Chothia and Lesk, J Mol Biol 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989), де описані способи, відомі фахівцям.

20 "Дикий тип" може стосуватися найбільш поширеного алеля або виду, присутнього у популяції, або антитіла, одержаного від тварини, яка не була піддана маніпуляціям, у порівнянні з алелем чи поліморфізмом, або варіантом чи похідним, одержаним в результаті якої-небудь маніпуляції, такої як мутагенез, використання рекомбінантних методів тощо, для заміни амінокислоти в молекулі, що зв'язується з антигеном.

25 Термін "фрагмент антитіла" стосується частини інтактного або повнорозмірного ланцюга або антитіла, звичайно цільової зв'язуючої або варіабельної ділянки. Приклади фрагментів антитіл включають, без обмеження, фрагменти Fab, Fab', F(ab')₂ та Fv. "Функціональний фрагмент" або "аналог антитіла проти сайту II IL-6" є фрагментом, який може запобігати або значно знижувати здатність IL-6 зв'язуватися з рецептором, знижувати здатність комплексу IL-6/IL-6R зв'язуватися з gp130, або знижувати здатність ліганду зв'язуватися з gp130 або ініціювати сигналінг. У

30 використуваному в даному документі значенні, "антигензв'язуючий фрагмент" або "функціональний фрагмент" загалом є синонімічними з "фрагментом антитіла" та можуть стосуватися фрагментів, таких як Fv, Fab, F(ab')₂ тощо, які можуть запобігати або значно знижувати здатність IL-6 зв'язуватися з рецептором, знижувати здатність комплексу IL-6/IL-6R зв'язуватися з gp130, або ініціювати сигналінг.

35 "Похідне" антитіла є поліпептидом, який включає щонайменше одну CDR антитіла, розкритого в даному документі. Типово, похідне може зв'язуватися із сайтом II IL-6.

"Конкурувати" означає, що перше антитіло або його фрагмент може конкурувати за зв'язування з другим антитілом або його фрагментом, внаслідок чого зв'язування першого антитіла з його епітопом детектовано знижується у присутності другого антитіла у порівнянні зі

40 зв'язуванням першого антитіла за відсутності другого антитіла. В деяких випадках, термін може також стосуватися зв'язування другого антитіла з його епітопом, яке детектовано знижується у присутності першого антитіла. Механізмом такої конкуренції може бути, в необмежувальних прикладах, стеричне ускладнення, конформаційна зміна, зв'язування зі спільним епітопом.

45 Термін "процент ідентичності послідовностей" в контексті послідовностей нуклеїнових кислот означає залишки в двох послідовностях, які є однаковими при вирівнюванні з максимальною відповідністю. Довжина порівняння ідентичності послідовностей може бути більше щонайменше приблизно дев'яти нуклеотидів, наприклад, щонайменше приблизно 18 нуклеотидів, щонайменше приблизно 24 нуклеотидів, щонайменше приблизно 28 нуклеотидів, щонайменше приблизно 32 нуклеотидів, щонайменше приблизно 36 нуклеотидів, або щонайменше

50 приблизно 48 чи більше нуклеотидів. Алгоритми, відомі фахівцям, можуть бути використані для вимірювання ідентичності нуклеотидних послідовностей. Наприклад, полінуклеотидні послідовності можуть бути порівняні з використанням FASTA, Gap або Bestfit (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI). FASTA, включає, наприклад, програми FASTA2 та FASTA3, забезпечує вирівнювання та проценти ідентичності

55 послідовностей ділянок найкращого перекривання між досліджуваною та шуканою послідовностями (Pearson, Methods Enzymol 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol Biol 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol 266:227-258 (1996); Pearson, J Mol Biol 276:71-84 (1998); включені до даного документу шляхом посилання). Типово використовують параметри за замовчуванням для конкретної програми або алгоритму. Наприклад, процент ідентичності

60 послідовностей між послідовностями нуклеїнових кислот може бути визначений з використанням

FASTA з її параметрами за замовчуванням (розмір слова 6 та NOPAM-фактор для оцінювальної матриці) або з використанням Gap з її параметрами за замовчуванням, яка входить до GCG Version 6.1, що включені до даного документу шляхом посилання.

Термін "процент ідентичності послідовностей" в контексті амінокислотних послідовностей означає залишки в двох послідовностях, які є однаковими при вирівнюванні з максимальною відповідністю. Довжина порівняння ідентичності послідовностей може бути більше щонайменше приблизно п'яти амінокислотних залишків, наприклад, щонайменше приблизно 20 амінокислотних залишків, щонайменше приблизно 30 амінокислотних залишків, щонайменше приблизно 50 амінокислотних залишків, щонайменше приблизно 100 амінокислотних залишків, щонайменше приблизно 150 амінокислотних залишків, або щонайменше приблизно 200 чи більше амінокислотних залишків. Ідентичності послідовностей для поліпептидів типово вимірюють з використанням прикладних програм для аналізу послідовностей. Алгоритми визначення процента ідентичності послідовностей відомі фахівцям. Наприклад, амінокислотні послідовності можуть бути порівняні з використанням FASTA, Gap або Bestfit (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI). Прикладні програми для аналізу білків порівнюють послідовності з використанням мір подібності, привласнюваних різним заміщенням, делеціям та іншим модифікаціям, включаючи консервативні амінокислотні заміщення. Наприклад, GCG включає такі програми, як "Gap" та "Bestfit", що можуть бути використані з параметрами за замовчуванням, визначеними у програмах, для визначення гомології послідовностей або ідентичності послідовностей між близько спорідненими поліпептидами, такими як гомологічні поліпептиди від різних видів організмів, або між білком дикого типу та його аналогом. Див., наприклад, GCG Version 6.1 (University of Wisconsin, Madison, WI). Поліпептидні послідовності також можуть бути порівняні з використанням FASTA з параметрами за замовчуванням або рекомендованими параметрами, див. GCG Version 6.1. FASTA (наприклад, FASTA2 та FASTA3) забезпечує вирівнювання та проценти ідентичності послідовностей ділянок найкращого перекривання між досліджуваною та шуканою послідовностями (Pearson, Methods Enzymol 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol Biol 132:185-219 (2000)). Іншим алгоритмом, який може бути використаний при порівнянні послідовності з базою даних, що містить велику кількість послідовностей від різних організмів, є комп'ютерна програма BLAST, наприклад, blastp або tblastn, з використанням параметрів за замовчуванням, передбачених у програмі. Див., наприклад, Altschul et al., J Mol Biol 215:403-410 (1990); Altschul et al., Nucleic Acids Res 25:3389-402 (1997).

Білок або поліпептид є "по суті чистим", "по суті гомогенним", або "по суті очищеним", якщо зразок щонайменше на приблизно від 60 до 75 % складається з одного виду поліпептиду. Поліпептид або білок може бути мономерним або мультимерним. По суті чистий поліпептид або білок може бути чистим на приблизно 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %; наприклад, по суті чистий поліпептид або білок є чистим на 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %. Чистоту або гомогенність білка можна оцінювати будь-якими придатними засобами, такими як електрофорез зразка білка на поліакриламідному гелі з подальшою візуалізацією однієї чи декількох смуг, асоційованих з білком або поліпептидом (наприклад, шляхом фарбування геля), гель-проникна ВЕРХ, катіонообмінна ВЕРХ, капілярний електрофорез у відновних умовах в присутності ДСН, пептидне картування або картування гліканів. Вища роздільна здатність може бути досягнена, наприклад, з використанням способів, відомих фахівцям, або інших методів очищення.

Термін "значний ступінь подібності" по відношенню до нуклеїнової кислоти або її фрагмента, означає, що при оптимальному вирівнюванні з відповідними інсерціями або делеціями нуклеотидів з іншою нуклеїновою кислотою (або її комплементарним ланцюгом), спостерігається ідентичність нуклеотидних послідовностей у щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, та щонайменше приблизно 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % нуклеотидних основ, наприклад, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовностей при вимірюванні за допомогою будь-якого відомого алгоритму (визначення) ідентичності послідовностей, такої як FASTA, BLAST або Gap.

По відношенню до поліпептидів, термін "значний ступінь ідентичності" або "значний ступінь подібності" означає, що дві амінокислотні послідовності, при оптимальному вирівнюванні, такому як за допомогою програм GAP або BESTFIT з використанням заданих за замовчуванням ваг гепів, визначених к програмах, мають щонайменше приблизно 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовностей; наприклад, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовностей. В певних варіантах реалізації, залишки в неідентичних положеннях відрізняються консервативними амінокислотними заміщеннями.

"Терапевтично ефективна кількість" стосується кількості терапевтичного агента, яка при введенні буде полегшувати щонайменше одну ознаку або симптом хвороби, лікування якої проводиться, або підсилювати чи поліпшувати профілактичний та або терапевтичний ефект (ефекти) іншої терапії (наприклад, іншого терапевтичного агента), придатного для лікування хвороби, асоційованої з IL-6. Слід розуміти, що терапевтично ефективна кількість може бути введена у вигляді множини доз за обмежений період часу або шляхом довготривалого лікування.

"Лікувати", "лікування" та "курс лікування" стосуються способу полегшення одного чи декількох ознак або симптомів хвороби.

У використовуваному в даному документі значенні, термін "хвороба" включає хвороби та розлади.

Опис кожного патентного документа та наукової статті, згадуваних в даному документі, та патентні документи і наукові статті, на які в них робляться посилання, прямо включені до даного документу шляхом посилання в усіх відношеннях.

Додаткові ознаки та переваги винаходу більш конкретно описані нижче.

СТИСЛИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фіг. 1 є графіком, що ілюструє результати експерименту, в якому антитіло проти IL-6 вводили інтравітреально (IVT) у щурячій моделі хоріоїдальної неоваскуляризації (ХНВ). Антитіло проти VEGF (судинний ендотеліальний фактор росту) вводили як позитивний контроль, а негативним контролем був носій. $p=0,0054$ в День 15 і $p=0,0005$ в День 22 для антитіла проти IL-6 порівняно з контрольним носієм.

Фіг. 2 є графіком, що ілюструє результати експерименту на зв'язування у випробуваннях здатності мишачого антитіла 64 інгібувати зв'язування IL-6/IL-6R з gp130.

Фіг. 3A є графіком, що ілюструє експеримент, у якому 020 тестували на здатність блокувати сигналінг IL-6 за відсутності надлишку розчинного IL-6R α . Експерименти проводили на клітинах HEK-Blue-IL-6 з 0,2 нг/мл IL-6 та 2 мкг/мл IL6R α .

Фіг. 3B є графіком, що ілюструє експеримент, у якому 020 тестували на здатність блокувати сигналінг IL-6 у присутності надлишку розчинного IL-6R α . Експерименти проводили на клітинах HEK-Blue-IL-6 з 0,2 нг/мл IL-6 та 2 мкг/мл IL6R α .

Фіг. 4 є графіком, що ілюструє результати експерименту, у якому моноклональне антитіло проти IL-6 ("Блокада IL-6") вводили інтравітреально у мишачій моделі ХНВ. Контролями були відсутність лікування (протилежне око), інтравітреальна ін'єкція антитіла проти VEGF ("Блокада VEGF") або інтравітреальна ін'єкція ізотипового контрольного антитіла проти пероксидази хрому (HRP) ("Контрольне антитіло").

Фіг. 5 показує зв'язування з IL-6, порівняно з антитілом дикого типу (EBI-029), в антитілах з такими мутаціями (1) I51T/S55G, (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T, /S55G, та (4) A28V/S30P/I51T/S55G (також називається EBI-030).

Фіг. 6 показує відносний сигналінг (fractional signaling) в HEK-Blue™ IL6 репортерних клітинах, оброблених IL-6 та одним з таких Fab: (1) WT (EBI-029), (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G, (4) A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030).

Фіг. 7 показує люмінесценцію (міра IL-6-індукованої проліферації) в клітинах T1165.85.2.1, оброблених IL-6 та одним з таких Fab у зазначеній концентрації: (1) WT (EBI-029), (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G, (4) A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030).

Фіг. 8 показує відносний сигналінг в репортерних клітинах HEK-Blue™ IL6, оброблених 20 пМ IL-6 та різними концентраціями (1) EBI-029 IgG2 (EBI029), продукованого у клітинах HEK-6E, (2) EBI-030 IgG2 (EBI030), продукованого у клітинах HEK-6E, та (3) EBI-030 IgG2-H311A (EBI030 H311A), продукованого у клітинах HEK-6E; (4) тоцилізумабу (TOCI), і (5) EBI-030 IgG2, продукованого у стабільному пулі клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO) (EBI-030 CHO).

Фіг. 9 зображує фармакокінетичну модель, описану у Прикладі 20.

Фіг. 10 зображує ефект зростаючої ефективності антитіла на тривалість інгібування IL-6 в оці, імітованого з використанням фармакокінетичної моделі, описаної у Прикладі 20.

Фіг. 11 показує зміни концентрації лікарських засобів EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030, EBI-030-H311A, Eylea®, та тоцилізумабу (TCZ) в склистому тілі у часі після інтравітреального введення.

Фіг. 12 показує зміни концентрації лікарських засобів EBI-029, EBI-030, EBI-030-H311A, Eylea®, та тоцилізумабу (TCZ) в сітківці у часі після інтравітреального введення.

Фіг. 13 показує зміни концентрації лікарських засобів EBI-029, EBI-030, EBI-030-H311A, Eylea®, та тоцилізумабу (TCZ) у водянистій волозі у часі після інтравітреального введення.

Фіг. 14 показує зміни концентрації лікарських засобів EBI-029, EBI-030, EBI-030-H311A, Eylea®, та тоцилізумабу (TCZ) у судинній оболонці у часі після інтравітреального введення.

Фіг. 15А зображує положення FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, CH1, шарнір, CH2, та CH3 у послідовності важких ланцюгів EBI-029 (SEQ ID NO: 11), EBI-030 (SEQ ID NO: 41), та EBI-031 (EBI-031 також називається в даному документі EBI-030-H311A) (SEQ ID NO: 47).

5 Фіг. 15В зображує положення FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, та СК у послідовності легкого ланцюга (EBI-029, EBI-030 та EBI-031 мають однакові послідовності легкого ланцюга) (SEQ ID NO: 12).

Фіг. 16А показує відносний сигналінг у HEK-Blue™ IL-6 репортерних клітинах, оброблених 20 пМ IL-6 та різними концентраціями EBI-031 або тоцилізумабу.

10 Фіг. 16В показує відносний сигналінг у HEK-Blue™ IL-6 репортерних клітинах, оброблених 200 пМ гіпер-IL-6 та різними концентраціями EBI-031 або тоцилізумабу.

Фіг. 17 показує результати математичного моделювання, описаного у Прикладі 24.

Фіг. 18 є схематичним зображенням трьох різних структурних ізоформ антитіл IgG2, утворених зсувом дисульфідного (зв'язку).

15 Фіг. 19 показує хроматограми ОФ-ВЕРХ зразків EBI-031: необроблені (верхня панель), 5 мМ дитіотреїтолу (DTT) (середня панель), 10 мМ цистеїну (нижня панель).

Фіг. 20 показує ОФ-ВЕРХ хроматограми зразків EBI-031, одержаних для різних клітинних ліній EBI-031: 200-літрової культури клональної клітинної лінії (верхня панель), 10-літрової культури батьківської клітинної лінії (середня панель), та стабільно трансфекованого пулу клітин (нижня панель).

20 Фіг. 21 показує ОФ-ВЕРХ хроматограму EBI-031, одержану для 200-літрової культури клональної клітинної лінії, і вказує та визначає кількості ізоформ, що відповідають кожному піку хроматограми.

Фіг. 22А є графіком, що показує фармакокінетичні дані для африканської зеленої мавпи (K797), як описано у Прикладі 26.

25 Фіг. 22В є графіком, що показує фармакокінетичні дані для африканської зеленої мавпи (K679), як описано у Прикладі 26.

Фіг. 23 є графіком, на якому показані фармакокінетичні дані для обох африканських зелених мавп (K797 або K679) та апроксимовані криві.

30 Фіг. 24А показує концентрацію лікарського засобу EBI-031 в рідині склистого тіла у часі після інтравітреального введення.

Фіг. 24В показує концентрацію лікарського засобу EBI-031 у водянистій волозі у часі після інтравітреального введення.

Фіг. 24С показує концентрацію лікарського засобу EBI-031 в судинній оболонці у часі після інтравітреального введення.

35 Фіг. 24D показує концентрацію лікарського засобу EBI-031 в кон'юнктиві у часі після інтравітреального введення.

Фіг. 24Е показує концентрацію лікарського засобу EBI-031 в рогівці у часі після інтравітреального введення.

40 Фіг. 24F показує концентрацію лікарського засобу EBI-031 у війковому тілі райдужки у часі після інтравітреального введення.

Фіг. 24G показує концентрацію лікарського засобу EBI-031 в кришталику у часі після інтравітреального введення.

Фіг. 24H показує концентрацію лікарського засобу EBI-031 в сітківці у часі після інтравітреального введення.

45 Фіг. 24I показує концентрацію лікарського засобу EBI-031 у склері у часі після інтравітреального введення.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС

Вважається, що IL-6 відіграє певну роль у ряді хвороб, таких як ревматоїдний артрит, і повідомлялося про його значну підвищувальну регуляцію у ряді хвороб, включаючи очні хвороби. IL-6 може діяти як за цис-, так і за транс-механізмами. В цис-механізмі вважається, що вільний IL-6 зв'язується з мембраннозв'язаним рецептором IL-6 (IL-6R також називається IL-6Rα та CD126), і комплекс IL-6/IL-6R потім взаємодіє з gp130 (також називається CD130, рецептором онкостатину М, IL-6Rβета, та трансдуктором сигналу IL-6), з активацією сигналінгу у клітині, що містить комплекс. У транс-механізмі, вільний IL-6 зв'язується з розчинним рецептором IL-6 (sIL-6R). Комплекс IL-6/sIL-6R може потім зв'язуватися з gp130, присутнім у клітинній мембрані. Ключова різниця між цими механізмами полягає в тому, що gp130 експресують більше типів клітин, ніж IL-6R, експресія якого є більш обмеженою. Отже, при хворобах, для яких бажано інгібувати сигналінг IL-6, наприклад при хворобах, для яких бажано інгібувати сигналінг IL-6 в широкому розумінні, корисно інгібувати як цис-, так і транс-сигналінг IL-6. Заявники сконструювали антагоністи IL-6, наприклад, антитіла проти IL-6, (ix) фрагменти та похідні, що

можуть інгібувати як цис-, так і транс-сигналінг IL-6. Крім того, заявники сконструювали такі антагоністи IL-6, що дозволяють досягти більш швидкого системного кліренсу. Антагоністи IL-6, наприклад, антитіла IL-6 та їх фрагменти або похідні, описані у WO2014/074905, повний зміст якого цим включений до даного документу шляхом посилання. Даний винахід стосується

удосконалених антитіл IL-6 та їх застосування.

У використовуваному в даному документі значенні, терміни в однині, включаючи, без обмеження, терміни, використовувані в англійському тексті з артиклями "a", "an" або "the", включають множину, якщо у контексті чітко не вказано інше.

Ознаки антагоністів IL-6 (IL-6a)

Заглом, антагоніст IL-6 (IL-6a), описаний в даному документі специфічно зв'язується із сайтом II (сайт 2) IL-6 та є придатним для лікування пов'язаної з IL-6 хвороби очей та певних інших хвороб. Пов'язаною з IL-6 хворобою очей є така, при якій небажаний симптом або біологічна активність хвороби асоційовані з експресією або присутністю IL-6. В деяких варіантах реалізації, IL-6a має високу афінність по відношенню як до вільного, так і до зв'язаного IL-6, є відносно стабільним в організмі, може інгібувати зв'язування з gp130 IL-6, зв'язаного з IL-6R (що називається в даному документі комплексом IL-6/IL-6R або IL-6/IL-6R), і може виявляти терапевтичний ефект. Загалом, IL-6a є антитілом або його одержують з антитіла. Наприклад, IL-6a є високоафінним гуманізованим Fab, який може специфічно зв'язуватися із сайтом II IL-6 та сильно блокує як цис-, так і транс-сигналінг IL-6. В іншому прикладі, IL-6a є повнорозмірним антитілом, наприклад, антитілом IgG1 або IgG2.

В деяких варіантах реалізації, Fab також має вигляд генетично модифікованої Fc-послідовності або входить до складу повнорозмірного антитіла. В деяких варіантах реалізації, IL-6a з генетично модифікованим Fc-фрагментом (наприклад, Fab з генетично модифікованим Fc-фрагментом) має більш швидкий системний кліренс порівняно з відповідним контролем, наприклад, порівняно з відповідним антитілом, його фрагментом або похідним, що не містять генетично модифікованого Fc. Ці та інші ознаки IL-6a додатково описані в даному документі.

Заявники розробили антагоністи IL-6, які селективно зв'язуються із сайтом II IL-6, забезпечуючи широке інгібування сигналінгу IL-6, тому що такі молекули можуть інгібувати зв'язування gp130 з IL-6, незалежно від того, чи є IL-6 вільним або зв'язаним з мембранним IL-6R або sIL-6R. Більш того, націлювання на ліганд (IL-6), а не на рецептор IL-6, дозволяє уникнути рецептор-медіованого кліренсу та токсичності внаслідок ADCC (опосередкованої антитілами клітинної цитотоксичності).

Оскільки IL-6 відіграє як патологічну, так і захисну роль при хворобі, використання антагоніста IL-6 (IL-6a) для лікування хвороби, асоційованої з підвищеним IL-6, може поліпшувати певні аспекти стану, але може також спричинювати значні небажані ефекти, наприклад, системні ефекти. Ця подвійність шляхів IL-6 (тобто, здатність мати бажані та/або небажані ефекти) може зробити небажаним лікування асоційованого з IL-6 розладу системним інгібітором. Відповідно, композиції та способи, запропоновані в даному документі, можуть бути придатними для лікування, що інгібує щонайменше одну активність IL-6, але не має надмірного впливу на позитивні активності IL-6, частково тому, що композиції можуть бути складені для місцевої доставки, наприклад, для місцевої доставки в око. Наприклад, в певних аспектах, IL-6a розроблений таким чином, щоб за розміром він був придатним для доставки у певне місце. В деяких варіантах реалізації, IL-6a є повнорозмірним антитілом. В деяких варіантах реалізації, IL-6a одержаний з антитіла та має формат, який може довше перебувати у склистому тілі ока та має обмежений системний витік. В деяких варіантах реалізації, IL-6a є модифікованим антитілом (наприклад, антитілом з модифікованим Fc-доменом), яке має довший час перебування у склистому тілі ока та/або більш обмежений системний витік порівняно з відповідним немодифікованим антитілом. В деяких варіантах реалізації, IL-6a є антитілом IgG2.

В деяких аспектах, IL-6a є відносно малим IL-6a, таким як фрагмент антитіла або інше похідне антитіла, яке є меншим, ніж повнорозмірне антитіло, наприклад, Fab, одержаний з антитіла IL-6. В деяких випадках, IL-6a має формат, який може переходити з однієї частини тканини в іншу з підвищеною кінетикою у порівнянні з відповідним повнорозмірним антитілом IL-6. В деяких варіантах реалізації, IL-6a є Fab, який був створений як молекула більшого розміру, що ймовірно матиме збільшений час перебування у ділянці доставки у порівнянні із самим лише Fab, наприклад, IL-6a димеризують через Fc-домен. В певних варіантах реалізації, Fc-домен модифікований таким чином, щоб Fc-фрагмент мав редуковане або знижене зв'язування з FcRn, що може зменшувати системне накопичення у порівнянні з таким самим фрагментом зв'язування IL-6, що включає Fc дикого типу. Модифікований Fc-домен може бути, наприклад, доменом IgG1 або доменом IgG2.

Типово, антагоністи IL-6, описані в даному документі, мають достатньо високу афінність по

відношенню до їх мішені, IL-6, для забезпечення ефективного полегшення ними щонайменше одного небажаного ефекту IL-6, та є достатньо стабільними для застосування як терапевтичні засоби.

Загалом, фармакокінетика (ПК) IL-6а, наприклад, IL-6а, придатного для застосування в оці, має достатньо довгий період напіввиведення у місці доставки, наприклад, склистому тілі, для забезпечення терапевтичного ефекту. У необмежувальних прикладах, фармакокінетика може передбачати період напіввиведення щонайменше 8 днів, 10 днів, 14 днів, 21 день, 28 днів, або 30 днів.

Ідентифікація антагоністів IL-6, які зв'язуються із сайтом II

Загалом, будь-який спосіб, відомий фахівцям, може бути використаний для створення молекули, яка може зв'язуватися з IL-6, наприклад, поліпептидні бібліотеки або молекулярні бібліотеки можуть бути піддані скринінгу для пошуку сполук-кандидатів шляхом проведення аналізу здатності поліпептиду або сполуки зв'язуватися з IL-6. після ідентифікації такої сполуки-кандидата, зв'язуючий сайт сполуки може бути визначений з використанням способів, відомих фахівцям. Наприклад, молекула може бути протестована на здатність зв'язуватися з IL-6 дикого типу і зв'язування порівнюють зі здатністю сполуки зв'язуватися з IL-6, мутованим у сайті I, сайті II, або сайті III. У варіантах реалізації, IL-6а, описаний в даному документі, зберігає здатність зв'язуватися з комплексом IL-6/IL-6R α та з IL-6, і запобігає зв'язуванню IL-6/IL-6R α з gp130. У варіантах реалізації, IL-6а, описаний в даному документі, може конкурувати з gp130 за зв'язування з комплексом IL-6/IL-6R α , наприклад, шляхом зв'язування із сайтом II IL-6. Такі активності зв'язування можуть бути оцінені з використанням способів, відомих фахівцям.

Кандидати IL-6а можуть бути протестовані, наприклад, з використанням системи HEK-Blue™ для проведення аналізу IL-6 (InvivoGen, San Diego). Клітини HEK-Blue™ IL-6 є клітинами HEK293, стабільно трансфектованими людським IL-6R та STAT3-індукованим репортерним геном SEAP. У присутності IL-6, STAT3 активується і секретується SEAP. SEAP оцінюють з використанням, наприклад, QUANTI-Blue™ (InvivoGen, San Diego). Додавання антагоніста IL-6 до клітин запобігає секреції або знижує рівень SEAP в результаті інгібування як вільного, так і зв'язаного з розчинним рецептором IL-6.

K_D стосується константи рівноваги афінності зв'язування конкретної взаємодії антитіло-антиген або взаємодії фрагмент антитіла-антиген. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент, описаний в даному документі, зв'язується з антигеном (наприклад, IL-6) з K_D , меншим ніж або рівним 250 пМ, наприклад, меншим ніж або рівним 225 пМ, 220 пМ, 210 пМ, 205 пМ, 150 пМ, 100 пМ, 50 пМ, 20 пМ, 10 пМ, або 1 пМ. K_D може бути визначений з використанням способів, відомих фахівцям, наприклад з використанням поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, з використанням системи BiaCore™.

K_{off} стосується константи швидкості дисоціації конкретної взаємодії антитіло-антиген або комплексу фрагмент антитіла-антиген. Константа швидкості дисоціації може бути визначена з використанням поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, з використанням системи BiaCore™. Відносно повільна K_{off} може підсилювати бажані ознаки лікарського засобу, наприклад, дозволяючи рідкіші введення інгібітора суб'єкту, що потребує такого лікування.

Специфічність

В деяких варіантах реалізації, IL-6а, описаний в даному документі, специфічно зв'язується з мішенню, наприклад, IL-6. Загалом, "специфічне зв'язування" у використовуваному в даному документі значенні вказує, що молекула переважно зв'язується з вибраною молекулою та виявляє набагато нижчу афінність зв'язування по відношенню до однієї чи декількох інших молекул. У варіантах реалізації, афінність зв'язування по відношенню до іншої молекули на 1, 2, 3 чи більше порядків величини нижче афінності зв'язування з мішенню.

Як було описано вище, IL-6 може бути присутнім у вигляді вільного IL-6 та у вигляді IL-6, зв'язаного з розчинним IL-6R α . Заявники ідентифікували сайт II IL-6 як оптимальну мішень для антагоніста IL-6 у порівнянні з інгібітором, який зв'язується із сайтом I IL-6. Інгібітор сайта I може інгібувати зв'язування вільного IL-6 з IL-6R α . Однак, такий інгібітор не може перешкоджати активності, ініційованій попередньо існувавшими комплексами IL-6/IL-6R α , за винятком заміщення, яке обмежене величиною K_{off} комплексу. Як інша альтернатива, інгібітор, який зв'язується з IL-6R α , є менш придатним, тому що він може мати обмежену здатність перешкоджати активності IL-6, якщо він присутній не в насичувальній концентрації. Оскільки кількість рецептора IL-6 є звичайно досить високою у порівнянні з кількістю IL-6, цей підхід може потребувати введення небажано великої кількості композиції, що інгібує активність IL-6 шляхом зв'язування з рецептором. У варіантах реалізації, антагоністи IL-6, описані в даному документі (наприклад, антитіла та їх фрагменти та похідні, описані в даному документі) можуть блокувати активність IL-6, навіть коли IL-6 зв'язаний з IL-6R. Відповідно, перевага IL-6а, описаного в

даному документі, полягає в тому, що може бути треба ввести відносно меншу кількість композиції для досягнення терапевтичного ефекту в порівнянні з інгібітором, націленим на рецептор IL-6. Повідомлялося, що антитіла проти рецептора швидко виводяться шляхом рецептор-медіованого кліренсу, що значно обмежує їх фармакокінетику (РК), і тому 5 потребують більш високих доз, частішого введення доз, або обох. Додатково, антитіла як проти рецептора, так і проти сайту I IL-6, створюють проблему, яка полягає в тому, що вони значно підвищують концентрацію IL-6 у тканині, порушуючи нормальний шлях рецептор-медіованого кліренсу ліганду, тим самим створюючи у суб'єкта потенційно небажані рівні IL-6 у тканині. Більш того, використання інгібітора, націленого на IL-6R α , може спричинити присутність 10 інгібітора як там, де інгібування потрібне, так і там, де воно є небажаним, наприклад, (внаслідок) системного лікування. Використання IL-6 α , який зв'язує сайт II, з яким зв'язується gp130, забезпечує можливість інгібування вільного IL-6, а також IL-6, який зв'язаний з IL-6R, але ще не активував шлях IL-6 через gp130. Відповідно, не бажаючи обмежуватися теорією, зазначимо, що антагоністи IL-6, описані в даному документі, призначені для зв'язування з обома формами 15 IL-6 (розчинною та зв'язаною з рецептором), конкретніше, антагоністи IL-6 зв'язуються із сайтом II IL-6, який є доступним в обох формах. Композиції, що містять IL-6 α , описаний в даному документі, можуть інгібувати як цис-, так і транс-сигналінг IL-6.

В деяких випадках, сполуки та способи, запропоновані в даному документі, призначені для забезпечення ефективної блокади IL-6, достатньої для лікування щонайменше однієї ознаки 20 або симптому розладу, асоційованого з IL-6, наприклад, інгібуючи ангиогенез і/або запалення.

Сполуки, описані в даному документі, є придатними для лікування хвороб ока, які характеризуються небажано високим рівнем IL-6, наприклад, у склистому тілі (див. Yuuki et al., J Diabetes Compl 15:257 (2001); Funatsu et al., Ophthalmology 110:1690 (2003); Oh et al., Curr Eye Res 35:1116 (2010); Noma et al., Eye 22:42 (2008); Kawashima et al., Jpn J Ophthalmol 51:100 (2007); Kauffman et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:900 (1994); Miao et al., Molec Vis 18:574(2012)). 25

Загалом, IL-6 α , описаний в даному документі, є сильним антагоністом сигналіngu IL-6. В деяких варіантах реалізації, IL-6 α , описаний в даному документі, має високу афінність по відношенню до IL-6, наприклад, з IC50 меншою ніж або рівною 100 пМ за результатами аналізу 30 IL-6 методом НЕК-Blue з використанням 10 пМ IL-6. Висока афінність IL-6 α може бути визначена на основі величини K_D IL-6 α , наприклад, при K_D, меншому ніж або рівному 1 нМ, меншому ніж чи рівному 500 пМ, меншому ніж чи рівному 400 пМ, меншому ніж чи рівному 300 пМ, меншому ніж чи рівному 240 пМ, або меншому ніж чи рівному 200 пМ.

Для одержання біологічного IL-6 α (наприклад, білка або поліпептиду, такого як антитіло, його фрагмент або похідне), придатного для лікування розладу, асоційованого з підвищеною експресією або активністю IL-6, типово бажано, щоб біологічний IL-6 α мав високу продуктивність. Наприклад, придатна продуктивність є більшою ніж чи рівною 1 г/л (наприклад, 35 більшою ніж чи рівною 2 г/л, більшою ніж чи рівною 5 г/л, або більшою ніж чи рівною 10 г/л).

Для ефективного введення антагоністу IL-6, необхідно, щоб інгібітор мав розчинність, 40 порівняну з концентрацією, в якій він буде вводиться. Наприклад, у випадку повнорозмірного антитіла IL-6 α , розчинність є більшою ніж чи рівною 20 мг/мл, більшою ніж чи рівною 10 мг/мл, більшою ніж чи рівною 5 мг/мл, або більшою ніж чи рівною 1 мг/мл.

Більш того, для забезпечення ефективного лікування, інгібітор повинен мати високу стабільність при температурі тіла на ділянках доставки та виявлення активності, а також 45 стабільність при зберіганні. У варіантах реалізації, інгібітор має T_m більшу ніж чи рівну 60 °C (наприклад, більшу ніж чи рівну 60 °C, більшу ніж чи рівну 62,5 °C, більшу ніж чи рівну 65 °C, більшу ніж чи рівну 70 °C, більшу ніж чи рівну 73 °C, або більшу ніж чи рівну 75 °C). У варіантах реалізації, інгібітор має T_{початку} більшу ніж чи рівну 45 °C, наприклад, більшу ніж чи рівну 50 °C, більшу ніж чи рівну 51 °C, більшу ніж чи рівну 55 °C, або більшу ніж чи рівну 60 °C. Способи визначення T_m та T_{початку} є відомими фахівцям. 50

Антагоністи, що мають бажані ознаки, можуть бути вибрані з придатних типів молекул, відомих фахівцям, наприклад, антитіл, включаючи фрагменти та похідні антитіла проти сайту II IL-6, які загалом зберігають або підтримують достатні ознаки батьківського антитіла IL-6 (наприклад, бажані властивості зв'язування). Такі антагоністи включають фрагменти F_{ab}, scFvs, 55 фрагменти F_{ab}, модифіковані шляхом включення фрагмента Fc, та повнорозмірні антитіла з модифікованим каркасом, що відрізняється від батьківського антитіла проти сайту II IL-6.

В деяких аспектах, IL-6 α , розкритий в даному документі, містить антигензв'язуючий сайт людського антитіла, який може конкурувати або перехресно конкурувати з антитілом або його фрагментом, що можуть зв'язуватися із сайтом II IL-6. Наприклад, антитіло або його фрагмент 60 можуть складатися з домену VH та домену VL, розкритих в даному документі, і домени VH та VL

включають набір CDR антитіла, яке зв'язує IL-6/сайт II, розкритого в даному документі.

Будь-який придатний спосіб може бути використаний для визначення домену та/або епітопу, зв'язуваного IL-6а, наприклад, шляхом мутування різних сайтів IL-6. Сайти, мутації у яких запобігають або знижують зв'язування IL-6а та ліганду IL-6, або безпосередньо беруть участь в зв'язуванні з IL-6а, або опосередковано впливають на зв'язуючий сайт, наприклад, впливаючи на конформацію IL-6. Інші способи можуть бути використані для визначення амінокислот, зв'язуваних IL-6а. Наприклад, може бути використане сканування по зв'язуванню пептидів (peptide-binding scan), таке як твердофазовий імуоферментний аналіз (ELISA) на основі методу PEPSCAN. При пептидному скануванні такого типу, короткі перекривні пептиди, одержані з антигену, піддають систематичному скринінгу на зв'язування зі зв'язувальним компонентом. Пептиди можуть бути ковалентно зв'язані з поверхнею носія для утворення пептидної матриці. Пептиди можуть бути в лінійній або напруженій конформації. Напружена конформація може бути одержана з використанням пептидів, що мають термінальні залишки цистеїну (cys) на кінцях пептидної послідовності. Залишки cys можуть бути ковалентно приєднані безпосередньо чи опосередковано до поверхні носія таким чином, щоб пептид утримувався в конформації петлі. Відповідно, пептид, використовуваний у способі, може мати залишки cys, додані до кожного кінця пептидної послідовності, що відповідає фрагменту антигену. Можуть бути використані також пептиди з подвійними петлями, у яких залишок cys додатково розташований у середній частині пептидної послідовності чи поблизу до неї. Залишки cys можуть бути ковалентно з'єднані безпосередньо чи опосередковано з поверхнею носія, так щоб пептиди утворювали конформацію з подвійними петлями, по одній петлі з кожного боку від центрального залишку cys. Пептиди можуть бути одержані методами синтезу, і тому залишки cys можуть бути введені в бажані положення, незважаючи на те, що в природі вони відсутні у послідовності сайту II IL-6. Необов'язково, як лінійні, так і напружені пептиди можуть бути використані для скринінгу в аналізі пептидного зв'язування. Пептидне сканування може передбачати ідентифікацію (наприклад, з використанням ELISA) набору пептидів, з якими зв'язується зв'язувальний компонент, у якому пептиди мають амінокислотні послідовності, що відповідають фрагментам IL-6а (наприклад, пептиди, що включають приблизно 5, 10 або 15 послідовно розташованих залишків IL-6а), і вирівнювання пептидів з метою визначення "сліду" (footprint) залишків, зв'язуваних зв'язувальним компонентом, причому "слід" включає залишки, які є спільними для перекривних пептидів. Альтернативно або додатково, спосіб пептидного сканування може бути використаний для ідентифікації пептидів, з якими зв'язується IL-6а, щонайменше, з вибраним співвідношенням сигнал:шум.

Інші способи, відомі фахівцям, можуть бути використані для визначення залишків, зв'язуваних антитілом, та/або для підтвердження результатів пептидного сканування, включаючи наприклад, сайт-спрямований мутагенез (наприклад, як описано в даному документі), воднево-дейтерієвий обмін, мас-спектрометрію, ЯМР та рентгенівську кристаллографію.

Типово, IL-6а, придатний для застосування, як описано в даному документі, є молекулою людського антитіла, молекулою гуманізованого антитіла, або їх зв'язуючим фрагментом. Загалом, антитіло є моноклональним антитілом. Таке антитіло може мати людське, мишаче, щуряче, верблюдяче, кроляче, овече, свине або бичаче походження і може бути одержане способами, відомими фахівцям.

Загалом, IL-6а містить щонайменше CDR антитіла, яке може специфічно зв'язуватися з IL-6 (наприклад, людським IL-6), наприклад, із сайтом II IL-6. Структурою, що несе CDR або набір CDR за винаходом, може бути послідовність важкого або легкого ланцюга антитіла або значна її частина, у якій CDR або набір CDR розташовані у положеннях, що відповідають CDR або набору CDR природних варіабельних доменів VH та VL антитіла, кодованих реаранжованими імуноглобуліновими генами. Структури та положення варіабельних доменів імуноглобуліну можуть бути визначені з посиланням на роботу Kabat, et al., 1983 (National Institutes of Health), та її оновлені редакції, які можна знайти за допомогою будь-яких засобів інтернет-пошуку по слову "Kabat".

IL-6а, розкритий в даному документі, типово є антитілом, яке звичайно включає домен VH і/або домен VL антитіла. Домен VH включає набір CDR важкого ланцюга (VHCDR), і домен VL включає набір CDR легкого ланцюга (VLCDR). Приклади таких CDR наведені в даному документі у прикладах. Молекула антитіла може включати домен VH антитіла, який включає VHCDR1, VHCDR2 та VHCDR3 та каркасну ділянку. Він може альтернативно або також включати домен VL антитіла, який включає VLCDR1, VLCDR2 та VLCDR3 та каркасну ділянку.

В даному документі розкриті антагоністи IL-6, що містять VHCDR1 і/або VHCDR2 і/або VHCDR3, такі як розкриті в даному документі, і/або VLCDR1 і/або VLCDR2 і/або VLCDR3, такі як

розкриті в даному документі. IL-6а може включати один чи декілька CDR будь-чого з антитіл, фрагментів або похідних, описаних в даному документі. IL-6а може включати набір VHCDR (наприклад, VHCDR1, VHCDR2, та VHCDR3), та необов'язково він може також включати набір VLCDR (наприклад, VLCDR1, VLCDR2, та VLCDR3). CDR можуть бути одержані з одного чи декількох антитіл, фрагментів або похідних, описаних в даному документі. Наприклад, VLCDR можуть бути одержані з того самого антитіла, що й VHCDR, або з іншого.

Звичайно, домен VH спарюється з доменом VL з утворенням антигензв'язуючого сайту антитіла. Наприклад, домен важкого ланцюга (HC) SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3 спарюється з доменом легкого ланцюга (LC) SEQ ID NO:2. В деяких випадках, як IL-6а може бути використаний один домен VH або VL.

В деяких аспектах, IL-6а є молекулою антитіла, її фрагментом або похідним, що включає (i) послідовність домену VH, яка має щонайменше 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 або 99 % ідентичності амінокислотних послідовностей з доменом VH, описаним в даному документі (наприклад, SEQ ID NO:37), або (ii) набір VHCDR (наприклад, VHCDR1, VHCDR2 і/або VHCDR3) з послідовності домену VH. У варіантах реалізації, молекула антитіла, її фрагмент або похідне включає VHCDR1, VHCDR2 та VHCDR3 SEQ ID NO:37. У варіантах реалізації, молекула антитіла, її фрагмент або похідне включає VHCDR1, VHCDR2 та VHCDR3, які колективно відрізняються від VHCDR1, VHCDR2 та VHCDR3 SEQ ID NO:37 не більш ніж на 1, не більш ніж 2, не більш ніж 3, не більш ніж 4, або не більш ніж 5 амінокислот.

Молекула антитіла, її фрагмент або похідне можуть також необов'язково включати (i) послідовність домену VL, яка має щонайменше 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 або 99 % ідентичності амінокислотних послідовностей з доменом VL, описаним в даному документі, наприклад, доменом VL SEQ ID NO: 38, або (ii) набір VLCDR (наприклад, VLCDR1, VLCDR2 і/або VLCDR3) з домену VL. У варіантах реалізації, молекула антитіла, її фрагмент або похідне включає VLCDR1, VLCDR2 та VLCDR3 SEQ ID NO: 38. У варіантах реалізації, молекула антитіла, фрагмент, або похідне включає VLCDR1, VLCDR2, та VLCDR3, які колективно відрізняються від VLCDR1, VLCDR2 та VLCDR3 SEQ ID NO:38 не більш ніж на 1, не більш ніж 2, не більш ніж 3, не більш ніж 4, або не більш ніж 5 амінокислот. Алгоритми, які можуть бути використані для обчислення процента ідентичності двох амінокислотних послідовностей, включають наприклад, BLAST, FASTA, або алгоритм Сміта-Уотермана (Smith-Waterman), наприклад, з використанням параметрів за замовчуванням.

IL-6а, описаний в даному документі, може включати константні області антитіла або їх частини, наприклад, константні області людського антитіла або їх частини. Наприклад, домен VL може бути з'єднаним своїм карбоксильним кінцем з константними доменами легкого ланцюга антитіла, включаючи людські ланцюги СК або CL. Аналогічно, IL-6а, оснований на домені VH, може бути з'єднаним своїм карбоксильним кінцем з усім або частиною (наприклад, доменом CH1) важкого ланцюга імунoglobуліну, одержаного з будь-якого ізотипу антитіла, наприклад, IgG, IgA, IgE та IgM та будь-яких підкласів ізотипу, зокрема IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4. У варіантах реалізації, антитіло або антигензв'язуючий фрагмент модифікують з метою зниження або усунення активності ADCC.

У варіанті реалізації, антитіло за винаходом є антитілом IgG2. У варіанті реалізації, антитіло за винаходом включає каркасну ділянку IgG2, константну область IgG2, або Fc-фрагмент IgG2, як описано в даному документі.

Антитіла IgG2 можуть існувати у вигляді трьох основних структурних ізоформ: IgG2-A, IgG2-B та IgG2-A/B (Wyrych J. et al. Journal of Biological Chemistry. 2008, 283:16194-16205). Ця структурна неоднорідність спричинена різними конфігураціями дисульфідних зв'язків, які з'єднують Fab-плечі з шарнірною областю важкого ланцюга. В ізоформі IgG2-A немає дисульфідних зв'язків, що з'єднують Fab-плечі з шарнірною областю. В ізоформі IgG2-B, обидва Fab-плеча мають дисульфідні зв'язки, які з'єднують важкий та легкий ланцюг з шарнірною областю. Ізоформа IgG2-A/B є гібридом між ізоформами IgG2-A та IgG2-B, і лише одно Fab-плече має дисульфідні зв'язки, що з'єднують важкий та легкий ланцюг одного Fab-плеча з шарнірною областю. Перетворення антитіла IgG2 між двома або усіма різними структурними ізоформами, яке також називається зсувом дисульфідного (зв'язку), відбувається природньо *in vivo* та *in vitro* як для природніх, так і для рекомбінантних антитіл. В результаті, композиції антитіл IgG2 у відомому рівні техніки містять гетерогенну суміш ізоформ IgG2-A, IgG2-B, та IgG2-A/B. Різні ізоформи IgG2 можуть мати унікальні та різні функціональні властивості, такі як відмінності у стабільності, агрегації, в'язкості, зв'язуванні Fc-рецепторів, або активності. Присутність численних ізоформ або підвищені рівні конкретної ізоформи в композиції антитіла IgG2 можуть негативно впливати на стабільність, агрегацію або ефективність.

Даний винахід пропонує антитіло, перевагою якого є те, що воно існує переважно у вигляді

ізоформ IgG2-A або IgG2-A/B. Антитіло за даним винаходом не існує у вигляді ізоформи IgG2-B, або не існує у вигляді ізоформи IgG2-B протягом значного періоду часу. Таким чином, композиції та рецептури, що включають антитіло за винаходом, є в меншому ступені гетерогенними, ніж інші антитіла IgG2, відомі фахівцям, і тому кращими для застосування у терапії.

Композиції, що містять антитіло за винаходом, включають переважно ізоформи IgG2-A і/або IgG2-A/B антитіла. У варіанті реалізації, композиція, що містить антитіло, описане в даному документі, включає щонайменше 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 або 99 % ізоформ IgG2-A або IgG2-A/B антитіла. У варіанті реалізації, композиція, що містить антитіло, описане в даному документі, включає щонайменше 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 або 99 % ізоформ IgG2-A та IgG2-A/B колективно. В таких варіантах реалізації, композиція, що містить антитіло, описане в даному документі, не містить значної кількості ізоформи IgG2-B антитіла. Наприклад, композиція включає менш ніж 10 %, 5 %, 2 %, 1 %, 0,5 % або 0,1 % ізоформи IgG2-B антитіла.

В деяких випадках, антитіло за винаходом додатково модифіковане з використанням способів, відомих фахівцям, з утворенням послідовності, що має специфічний алотип, наприклад, алотип, який домінує в популяції, що має конкретне географічне походження. В деяких випадках, для цього модифікують константну область людського важкого ланцюга.

IL-6а може бути молекулою антитіла, її зв'язуючим фрагментом або варіантом, що має одну чи декілька CDR, наприклад, набір CDR, в каркасній ділянці антитіла. Наприклад, одна чи декілька CDR або набір CDR антитіла (наприклад, антитіла або його фрагмента або похідного, як описано в даному документі) можуть бути прищеплені на каркасну ділянку (наприклад, каркасну ділянку людини) для створення молекули антитіла. Каркасні ділянки можуть бути одержані з послідовностей гена зародкової лінії людини, або походити не від зародкової лінії.

Залишки каркасної ділянки VH та/або VL можуть бути модифіковані, як описано та проілюстровано в даному документі, наприклад, з використанням сайт-спрямованого мутагенезу.

Заміни амінокислот можуть бути зроблені в одній чи декількох каркасних ділянках і/або одній чи декількох CDR, одержаних з антитіла IL-6а, націленого на сайт II IL-6 (називаного в даному документі "референсним антитілом IL-6") з використанням способів та параметрів, відомих фахівцям. Також до обсягу даного документу входить одержаний антагоніст IL-6, який зберігає здатність до зв'язування із сайтом II IL-6 (наприклад, сайтом II людського IL-6) і типово має принаймні таке саме зв'язування або підвищену афінність у порівнянні з референсним антитілом IL-6. В деяких випадках, для поліпшення параметра, такого як стабільність, може бути введена заміна, яка приводить до зниження афінності зв'язування одержуваного IL-6а у порівнянні з референсним IL-6а (наприклад, референсним антитілом) для створення корисного IL-6а. В деяких варіантах реалізації, наприклад, в деяких випадках, коли порівняння стосується зв'язування з FcRn або фармакокінетичного (PK) параметра, такого як період напіввиведення у склистовому тілі або системний період напіввиведення (наприклад, у крові, плазмі, сироватці, лімфі, печінці, нирці, іншій тканині, або рідині організму), референсне антитіло може бути антитілом, яке не зв'язується специфічно з IL-6.

Заміна в амінокислотній послідовності IL-6а поліпептиду може включати заміщення одного чи декількох амінокислотних залишків на неприродну або нестандартну амінокислоту, модифікацію одного чи декількох амінокислотних залишків в неприродну або нестандартну форму, або вставку однієї чи декількох неприродних або нестандартних амінокислот в послідовність. Приклади числа та положень змін у послідовностях за винаходом описані в інших розділах даного документу. Природні амінокислоти включають 20 "стандартних" L-амінокислот, позначуваних їх стандартними однобуквеними кодами G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E. Нестандартні амінокислоти включають будь-який інший залишок, що може бути включений в поліпептидний скелет або утворюється в результаті модифікації існуючого амінокислотного залишку. Нестандартні амінокислоти можуть бути природними або неприродними. Декілька природних нестандартних амінокислот є відомими фахівцям, такі як 4-гідроксипролін, 5-гідроксилізін, 3-метилгістидин та N-ацетилсерин. Ці амінокислотні залишки, дериватизовані в їх N-альфа-положенні, будуть розташовані тільки на N-кінці амінокислотної послідовності. Амінокислота типово є L-амінокислотою. В деяких випадках, амінокислота є D-амінокислотою. Заміна може, таким чином, включати модифікацію L-амінокислоти з її перетворенням на, або її заміщення на D-амінокислоту. Метильовані, ацетильовані та/або фосфорильовані форми амінокислот також є відомими, і амінокислоти в даному винаході можуть бути піддані такій модифікації.

Амінокислотні послідовності в доменах та зв'язувальних компонентах антитіла за винаходом може включати неприродні або нестандартні амінокислоти, як описано в даному документі.

Нестандартні амінокислоти (наприклад, D-амінокислоти) можуть бути включені в амінокислотну послідовність з використанням способів, відомих фахівцям, наприклад, при синтезі молекули або шляхом подальшої модифікації чи заміни амінокислоти. В деяких випадках, D-амінокислота використовується для підвищення фармакокінетики (PK) IL-6a.

Нові VH- або VL-ділянки, що несуть одержані з CDR послідовності за винаходом, можуть бути одержані з використанням неспецифічного мутагенезу однієї чи декількох вибраних VH-та/або VL-послідовностей нуклеїнових кислот для створення мутацій в усьому варіабельному домені. Наприклад, може бути використана помилково-спрямована ПЛР (Chao et al., Nature Protocols, 1:755-768 (2006)). В деяких варіантах реалізації, роблять одне чи два амінокислотних заміщення в усьому варіабельному домені або наборі CDR. Інші способи, відомі фахівцям, можуть бути використані для створення мутацій, наприклад, сайт-спрямований мутагенез, типово, в одній чи декількох CDR.

Один спосіб одержання антитіла IL-6a полягає в зміні домену VH, такого як розкритий в даному документі, шляхом додавання, делеції, заміщення або вставки однієї чи декількох амінокислот. Змінений домен VH може бути об'єднаний з доменом VL (наприклад, доменом VL, розкритим в даному документі), який також може бути змінений, як описано в даному документі, та з використанням способів, відомих фахівцям. Такі змінені молекули тестують на їх здатність зв'язуватися із сайтом II IL-6 та, необов'язково, на інші бажані властивості, такі як підвищена афінність у порівнянні з референсною молекулою. В деяких випадках, варіант домену VH або VL може мати 1, 2, 3, 4 або 5 таких змін (наприклад, 1, 2, 3, 4 або 5 амінокислотних заміщень).

У варіантах реалізації, IL-6a за винаходом є фрагментом антитіла, який зв'язується із сайтом II IL-6 та включає антигензв'язуючий сайт, наприклад, може зв'язуватися із сайтом II IL-6. Фрагменти антитіла за винаходом звичайно одержують починаючи з референсної (батьківської) молекули антитіла, такої як молекула антитіла, що включає SEQ ID NO:41 та SEQ ID NO:42. Фрагменти антитіла можуть бути одержані з використанням способів, відомих фахівцям, таких як методи рекомбінантної ДНК, ферментативне розщеплення (наприклад, з використанням пепсину або папаїну), хімічне розщеплення антитіла (наприклад, хімічне відновлення дисульфідних місточків). Фрагменти антитіла, що містять антигензв'язуючий сайт антитіла, включають, без обмеження, такі молекули, як Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd, та варіабельну ділянку, стабілізовану дисульфідними зв'язками (dsFv). Можуть бути сконструйовані різні інші молекули антитіла, що містять один чи декілька антигензв'язуючих сайтів антитіла, включаючи, наприклад, F(ab'')₂, F(ab)₃, діатіла, триатіла, тетратіла та мінітіла. Приклади молекул антитіла та способи їх побудови та застосування описані у Holliger and Hudson, 2005, Nat Biotechnol 23:1126-1136. Необмежувальними прикладами зв'язуючих фрагментів є фрагмент Fab, що складається з доменів VL, VH, константного домену легкого ланцюга (CL) та константного домену 1 важкого ланцюга (CH1); фрагмент Fd, що складається з доменів VH та CH1; фрагмент Fv, що складається з доменів VL та VH одного антитіла; фрагмент dAb що складається з домену VH або VL; виділені ділянки CDR; фрагмент F(ab'')₂, бівалентний фрагмент, що включає два з'єднані Fab-фрагменти; одноланцюгова молекула Fv (scFv), у якій домен VH та домен VL з'єднані пептидним лінкером, що дозволяє двом доменам асоціюватися з утворенням антигензв'язуючого сайту; біспецифічний одноланцюговий Fv-димер (наприклад, розкритий у WO 1993/011161), та діатіло, яке є мультівалентним або мультиспецифічним фрагментом, сконструйованим шляхом злиття генів (наприклад, як розкрито в WO94/13804). Молекули Fv, scFv або діатіла можуть бути стабілізовані шляхом включення дисульфідних місточків, що з'єднують домени VH та VL. Мінітіла, що включають scFv, з'єднаний з доменом CH3, також можуть бути використані як IL-6a. Інші фрагменти та похідні антитіла, що можуть бути використані як IL-6a, включають Fab', який відрізняється від фрагмента Fab доданням декількох амінокислотних залишків на карбоксильному кінці домену CH1 важкого ланцюга, включаючи один чи декілька цистеїнів з шарнірної області антитіла, та Fab'-SH, що є фрагментом Fab', у якому цистеїновий залишок (залишки) константних доменів несе вільну тіольну групу.

В деяких випадках, IL-6a, який є фрагментом антитіла, був хімічно модифікованим для поліпшення або створення бажаної властивості, наприклад, шляхом пегілювання для збільшення періоду напіввиведення або включення.

dAb (доменне антитіло) є малим мономерним антигензв'язуючим фрагментом антитіла (варіабельною ділянкою важкого або легкого ланцюга антитіла). VH dAb зустрічаються в природі у верблюдячих (наприклад, верблюдів та лам) і можуть бути одержані шляхом імунізації тварини родини верблюдячих цільовим антигеном, виділення антиген-специфічних В клітин та прямого клонування генів dAb з індивідуальних В-клітин. IL-6a за даним винаходом може бути dAb, що містить домен VH або VL, по суті як описано в даному документі, або доменом VH або

VL, що містить набір CDR, по суті як описано в даному документі.

Антитіла за винаходом включають біспецифічні антитіла, у яких дві різні варіабельні ділянки об'єднані в одній молекулі. IL-6а можуть бути включені як частина біспецифічного антитіла, одержаного з використанням способів, відомих фахівцям, наприклад, одержаного хімічними методами або з гібридних гібридом. Така молекула може бути біспецифічним фрагментом антитіла описаного вище типу. Одним з необмежувальних прикладів способу одержання біспецифічного антитіла є технологія BiTE™, у якій можуть бути використані зв'язуючі домени двох антитіл з різною специфічністю, з'єднані та через короткі гнучкі пептиди. Це поєднує два антитіла на одному короткому поліпептидному ланцюзі. Діатіла та scFv можуть бути сконструйовані без ділянки Fc, з використанням лише варіабельних доменів, потенційно зменшуючи ефекти антиідіотипової реакції. Біспецифічні антитіла можуть бути сконструйовані як цілий IgG, як біспецифічний Fab'2, як Fab'PEG, як діатіла або ж як біспецифічний scFv. Додатково, два біспецифічні антитіла можуть бути з'єднані з використанням звичайних способів створення тетравалентних антитіл, відомих фахівцям.

Біспецифічні діатіла, на відміну від біспецифічних цільних антитіл, є корисними, частково тому, що вони можуть бути сконструйовані та експресовані у *E. coli*. Діатіла (і багато інших поліпептидів, таких як фрагменти антитіл) з придатними специфічностями зв'язування можуть бути легко вибрані з використанням фагового дисплея (WO 1994/13804) з бібліотеки. Якщо одно плече діатіла залишається постійним, наприклад, зі специфічністю, спрямованою проти сайту II IL-6, то можна підготувати бібліотеку, у якій друге плече змінюється, та вибрати антитіло з придатною специфічністю.

Біспецифічні цільні антитіла можуть бути одержані альтернативними методами генної інженерії, як описано у WO 1996/27011, WO 1998/50431 та WO 2006/028936.

В деяких випадках, IL-6а за винаходом містить антигензв'язуючий сайт, розташований не в молекулі антитіла, наприклад, шляхом включення однієї чи декількох CDR, наприклад, набору CDR, в білковий каркас, що не належить антитілу, як додатково описано нижче. В деяких випадках, CDR включені в каркас, що не належить антитілу. Сайт, що зв'язується із сайтом II IL-6, може бути створений шляхом розташування CDR на білкових каркасах, що не належить антитілу, таких як фібронектин або цитохром В, або шляхом рандомізації або мутування амінокислотних залишків петлі у білковому каркасі для надання специфічності зв'язування по відношенню до сайту II IL-6. Каркаси для створення нових зв'язуючих сайтів в білках є відомими фахівцям. Наприклад, білкові каркаси для міміків антитіл розкриті в WO200034784, який описує білки (міміки антитіла), що включають домен фібронектину типу III, який має щонайменше одну рандомізовану петлю. Придатний каркас, на який прививають одну чи декілька CDR, наприклад, набір HCDR, може бути одержаний з будь-якого доменного компонента суперсімейства гена імуноглобуліну. Каркас може бути людським або не-людським білком. Перевага білкового каркаса, що не належить антитілу, полягає в тому, що він може забезпечувати антигензв'язуючий сайт в каркасній молекулі, яка є меншою і/або може бути легше одержана, ніж принаймні деякі молекули антитіл. Малий розмір зв'язувального компонента може надавати корисні фізіологічні властивості, такі як здатність заходити усередину клітин, проникати глибоко в тканини або досягати мішеней в інших структурах, або зв'язуватися усередині білкових "кишень" антигена-мішені. Типовими є білки, що мають стабільний основний ланцюг та одну чи декілька варіабельних петель, у яких амінокислотна послідовність петлі або петель є специфічно або випадково мутованою для створення антигензв'язуючого сайту, що зв'язує антиген-мішень. Такі білки включають IgG-зв'язуючі домени білка *A. S. aureus*, трансферин, тетранектин, фібронектин (наприклад, з використанням 10-го домену фібронектину тип III), ліпокаліні, а також гамма-кристалін та інші каркаси Affilin™ (Scil Proteins, Halle, Germany). Приклади інших підходів включають синтетичні мікротіла на основі циклотидів – малих білків, що мають інтрамолекулярні дисульфідні зв'язки, мікропротеїни (наприклад, Versabodies™, Amunix Inc., Mountain View, CA) та білки з анкіриновими повторами (дарпіни (DARPs), наприклад, фірми Molecular Partners AG, Zurich-Schlieren, Switzerland). Такі білки також включають малі генетично модифіковані білкові домени, такі як, наприклад, імунодомени (див. наприклад, публікації патентів США №№ 2003/082630 та 2003/157561). Імунодомени містять щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) антитіла.

IL-6а може включати додаткові амінокислоти, наприклад, для надання молекулі інших функціональних характеристик крім здатності зв'язуватися з антигеном.

В деяких випадках, IL-6а несе детектовану мітку, або є кон'югованим з токсином або націлювальним фрагментом або ферментом (наприклад, через пептидильний зв'язок або лінкер). Наприклад, IL-6а може включати каталітичний сайт (наприклад, у ферментному домені), а також антигензв'язуючий сайт (наприклад, сайт, що зв'язується із сайтом II IL-6), так щоб

антигензв'язуючий сайт зв'язувався з антигеном і, таким чином, націлював каталітичний сайт на IL-6 або комплекс IL-6/IL-6R. Каталітичний сайт може, в деяких випадках, додатково інгібувати біологічну функцію IL-6, наприклад, шляхом розщеплення IL-6, IL-6R або іншої молекули, асоційованої з комплексом IL-6a/IL-6.

В деяких аспектах, винахід включає антитіло IL-6a, яке було модифіковане у порівнянні з референсним антитілом з метою зміни, наприклад, підвищення, зниження або усунення, функції біологічного ефекту IL-6a. В одному прикладі, Fc-ділянка є модифікованою або батьківський Fc-домен заміщений на модифікований Fc-домен для зміни фармакокінетики модифікованого IL-6a у порівнянні з немодифікованим батьківським. В деяких варіантах реалізації, IL-6a модифікований таким чином, щоб він мав каркасну ділянку IgG2. В інших варіантах реалізації, IL-6a розташований в каркасній ділянці IgG1 або IgG2 та має модифікований Fc, що підвищує афінність зв'язування IL-6a при pH 6,0 та істотно не змінює афінність зв'язування при pH 7,0 у порівнянні з батьківським або іншим референсним IL-6a. У варіантах реалізації, Fc-домен є модифікованим і IL-6a має знижене системне накопичення, зменшений період напіввиведення, і/або підвищений системний кліренс у порівнянні з батьківським або іншим референсним IL-6a.

В деяких варіантах реалізації, антитіло IL-6a модифіковане для збільшення фіксації комплементу та комплемент-залежної цитотоксичності. В інших аспектах, антитіло IL-6a модифіковане для збільшення здатності антитіла у порівнянні з референсним антитілом активувати ефекторні клітини та брати участь у антитіло-залежній цитотоксичності (ADCC). В деяких випадках, антитіла, розкриті в даному документі, можуть бути модифіковані як для підвищення їх здатності активувати ефекторні клітини та участі в антитіло-залежній цитотоксичності (ADCC), так і для посилення їх здатності до фіксації комплементу та участі в комплемент-залежній цитотоксичності (CDC).

В деяких варіантах реалізації, антитіла, розкриті в даному документі, модифіковані для зниження їх здатності фіксувати комплемент та брати участь в комплемент-залежній цитотоксичності (CDC). В інших варіантах реалізації, антитіла модифіковані для зниження їх здатності активувати ефекторні клітини та брати участь в антитіло-залежній цитотоксичності (ADCC). В ще інших варіантах реалізації, антитіло, розкрите в даному документі, може бути модифікованим як для зниження його здатності активувати ефекторні клітини та брати участь в антитіло-залежній цитотоксичності (ADCC), так і для зниження його здатності фіксувати комплемент та брати участь в комплемент-залежній цитотоксичності (CDC).

Звичайно є кращим уникати частого введення доз IL-6a, наприклад, при доставці шляхом ін'єкції в око. Для сприяння цьому, в певних варіантах реалізації, період напіввиведення IL-6a, розкритого в даному документі, в місці доставки, наприклад, склистому тілі, становить щонайменше 4 дні, наприклад, щонайменше 7 днів, щонайменше 9 днів, щонайменше 11 днів, або щонайменше 14 днів. В певних варіантах реалізації, середній період напіввиведення IL-6a становить щонайменше 2 дні, 3 дні, 4 дні, 5 днів, 6 днів, 7 днів, 8 днів, 9 днів, 10 днів, 11 днів, 12 днів, 13 днів, 14 днів, 15 днів, 16 днів, 17 днів, 18 днів, 19 днів, 20 днів, 25 днів, 30 днів, 40 днів, 50 днів, або 60 днів. Способи збільшення періоду напіввиведення антитіла відомі фахівцям, наприклад, як описано у патенті США № 6277375 та міжнародних публікаціях №№ WO 1998/23289 та WO 1997/3461. В деяких варіантах реалізації, період напіввиведення IL-6a в місці доставки до мішені, наприклад, склистому тілі, є більшим, ніж системний період напіввиведення, наприклад, період напіввиведення з крові, сироватки, плазми, лімфи, печінки, нирки, або іншої тканини або рідини організму.

В іншому варіанті реалізації, винахід пропонує виріб, що включає контейнер. Контейнер містить композицію, що містить IL-6a, розкритий в даному документі, та вкладиш до упаковки або ярлик, де зазначено, що композиція може бути використана для лікування розладу, пов'язаного з IL-6. Типово, композиція є IL-6a в композиції, яка містить фармацевтично прийнятний ексципієнт.

В деяких випадках, винахід пропонує набір, що містить композицію, яка містить IL-6a, розкритий в даному документі, та інструкції щодо введення композиції суб'єкту, що потребує лікування.

У варіантах реалізації, в яких бажаним є великий за розміром IL-6a, наприклад, для підвищення утримування IL-6a у місці доставки або поблизу до нього, з IL-6a може бути асоційований фрагмент, який збільшує розмір, але не має значного негативного впливу на функцію IL-6a (наприклад, афінність зв'язування IL-6 з IL-6 або комплексом IL-6/IL-6R). Наприклад, Fab може бути генетично модифікованим для експресії у вигляді одного поліпептиду, що містить Fab та Fc-фрагмент.

У варіантах реалізації, в яких бажаним є відносно малий розмір IL-6a, можуть бути використані фрагменти антитіла IL-6, наприклад, фрагмент scFv або Fab. Антитіло IgG має

розмір близько 150 кДа, Fab – близько 50 кДа, і scFv – близько 25 кДа. В деяких варіантах реалізації, IL-6а, описаний в даному документі, має розмір менш ніж приблизно 50 кДа. Такий антагоніст може бути, наприклад, меншим ніж або рівним 50 кДа та більшим ніж 10 кДа, меншим ніж або рівним 50 кДа та більшим ніж 20 кДа, або меншим ніж чи рівним 50 кДа та більшим ніж чи рівним 25 кДа.

В деяких випадках, стабільність антагоніста IL-6, наприклад, антитіла або іншого інгібітора, що має дисульфідні зв'язки, поліпшують шляхом створення варіанта, в якому один чи декілька з дисульфідних місточков є більш стабільними, ніж у батьківській молекулі.

Іншою перевагою певних молекул IL-6а, описаних в даному документі, може бути доступність ефективних молекул, що мають розмір, придатний для їх способу доставки, місця доставки, або способу виявлення активності. Наприклад, IL-6а у форматі Fab може бути використаний для місцевого застосування. Способи конструювання таких молекул описані в даному документі та відомі фахівцям.

Показання/Хвороба, асоційована з IL-6

Хвороби, які можна лікувати IL-6а за винаходом, включають хвороби, при яких підвищений IL-6 асоційований з хворобливим станом або є передумовою хворобливого стану. Такі хвороби включають ті, у яких ангіогенез та запалення, спричинювані IL-6, роблять свій внесок в патологію хвороби. Сюди входять хвороби, при яких IL-6 є підвищеним у порівнянні з нормальними рівнями, наприклад, хвороби, при яких IL-6 є підвищеним у склистому тілі (такі як, наприклад, діабетичний макулярний набряк, діабетична ретинопатія та увеїт) або тканинах ока. Приклади включають певні хвороби ока, включаючи, без обмеження, сухі очі (наприклад, хворобу сухих очей або сухий кератокон'юнктивіт), алергічний кон'юнктивіт, увеїт, вікову макулярну дегенерацію (ВМД), проліферативну діабетичну ретинопатію (ПДР), діабетичний макулярний набряк (ДМН), регматогенне відшарування сітківки (РВС), оклюзії вен сітківки (ОВС), нейромієліт зорового нерва (НЗН). Інші очні розлади, лікування яких може проводитись, включають спричинені травмою, такою як пересадження рогівки, подряпина рогівки, або іншим таким фізичним ушкодженням ока. Відповідно, винахід включає лікування суб'єкта з хворобою, пов'язаною з IL-6, за допомогою IL-6а, описаного в даному документі.

В деяких варіантах реалізації, хвороба, асоційована з IL-6, є запальною хворобою. В деяких варіантах реалізації, хвороба є глаукомою.

В деяких варіантах реалізації, хвороба є очним болем.

В деяких варіантах реалізації, лікування суб'єкта також включає визначення того, чи має суб'єкт хворобу, асоційовану з IL-6, та, необов'язково, чи є суб'єкт несприйнятливим до інших видів лікування, не пов'язаних з інгібуванням IL-6, таких як стероїди або лікарські засоби проти судинного ендотеліального фактора росту (VEGF).

Однією проблемою певних лікарських засобів на основі антитіл, ефективних для застосування в конкретному місці, такому як око, наприклад, у склистому тілі, є небажані ефекти, що виникають при системному введенні. Одним з рішень є створення лікарських засобів, що можуть бути доставлені місцево, а не системно, прикладами яких є молекули, описані в даному документі. Оскільки деякі лікарські засоби для місцевої доставки, наприклад, в склисте тіло, будуть, в певному ступені, потрапляти в системний кровообіг, було б бажано сконструювати молекулу, яка б мала відносно швидкий системний кругообіг. Заявники сконструювали приклади антитіла IL-6, призначені для швидкого системного кругообігу, наприклад, у порівнянні з батьківською молекулою або референсним антитілом. Це було здійснено шляхом мутації Fc-домену для модифікації зв'язування молекули з FcRn, наприклад, для зниження медіованого FcRn рециклінга IL-6а.

Діабетичний макулярний набряк (ДМН). Діабетичний макулярний набряк (ДМН) включає оклюзію та просочування кровоносних судин сітківки, спричинюючи зниження гостроти зору і, потенційно, сліпоту. Стандартне лікування ДМН включає місцеве введення стероїдів або антитіл проти VEGF. Однак, багато пацієнтів є несприйнятливими до цих терапій. Патогенез діабетичного макулярного набряку включає компоненти ангіогенезу, запалення та окисного стресу. IL-6 індукується гіпоксією та гіперглікемією і може підсилювати судинне запалення, судинну проникність та патологічний ангіогенез. IL-6 може напряму індукувати експресію VEGF та може промотувати хоріоїдальну неоваскуляризацію в тваринних моделях. У пацієнтів з ДМН, очні рівні IL-6 позитивно корелюють з товщиною жовтої плями та тяжкістю хвороби. Повідомлялося, що рівні IL-6 є підвищеними у пацієнтів з невдалою анти-VEGF терапією, але знижуються у пацієнтів, сприйнятливих до засобів проти VEGF. Відповідно, введення IL-6а, описаного в даному документі, є придатним для лікування діабетиків в комбінації з анти-VEGF лікарським засобом або як альтернатива анти-VEGF лікуванню, в тому числі для пацієнтів, несприйнятливих до анти-VEGF терапії. Лікування макулярного набряку за допомогою IL-6а

може також підвищувати безпеку за рахунок усунення необхідності повного інгібування одного з механізмів для інгібування патології, таким чином зберігаючи певну частку бажаної фізіологічної ролі кожного цитокіну. Відповідно, місцеве лікування за допомогою IL-6a в комбінації з інгібуванням VEGF може зменшити частоту введення доз та знизити небажані ефекти лікування.

При ДМН спостерігається позитивна кореляція між рівнями IL-6 у скупистому тілі та як тяжкістю хвороби, так і суб'єктами, несприйнятливими до VEGF. Відповідно, IL-6a, описаний в даному документі, може бути використаний для лікування суб'єктів з ДМН, несприйнятливих до стероїдної терапії, анти-VEGF терапії, чи обох. В деяких випадках, IL-6a використовують в комбінації з анти-VEGF терапією або стероїдною терапією, наприклад, для лікування ДМН.

IL-6a, описаний в даному документі, може бути використаний також для лікування розладів, таких як рак, наприклад, рак простати, лейкоз, множинна мієлома, запальні (такі як хронічні запальні проліферативні хвороби) та аутоімунні хвороби, наприклад, ревматоїдний артрит, хвороба Кастлемана (гігантська або ангіофолікулярна гіперплазія лімфатичних вузлів), ювенільний ідіопатичний артрит (включаючи багатосуставний ювенільний ідіопатичний артрит та системний ювенільний ідіопатичний артрит), хвороба Стілла (включаючи ювенільний ідіопатичний артрит та хворобу Стілла дорослих), хвороба Стілла дорослих, АА-амілоїдоз, ревматична поліміалгія, ремітивний серонегативний симетричний синовіт з ямковим набряком, спондилоартрит, хвороба Бехчета (включаючи лікування очних проявів), атеросклероз, псоріаз, системний червоний вовчак, поліміозит (запальна міопатія), хронічний атрофічний поліхондрит, набута гемофілія А, множинний склероз, анемія запалення, та хвороба Крона.

Антагоністи IL-6 є також придатними для лікування певних неврологічних хвороб, наприклад, депресії, та хвороби Альцгеймера.

Інші хвороби, які можна лікувати IL-6a, описаним в даному документі, включають, без обмеження, системний склероз, синдром Такаюсу, гігантоклітинний артеріїт, хворобу "трансплантат проти хазяїна", та періодичний синдром, асоційований з мутацією гена рецептора фактора некрозу пухлини (TRAPS).

Дозування

Антитіло IL-6 або його фрагмент може бути введене суб'єкту (наприклад, пацієнту) який експресує, наприклад, аномально високі рівні IL-6. Антитіло або його фрагмент може бути введене однократно, або може бути введене багаторазово. Антитіло може вводитися, наприклад, від трьох разів на день до одного разу на шість місяців чи більше. Введення можуть робитися за графіком, таким як тричі на день, двічі на день, один раз в день, один раз в два дні, один раз в три дні, один раз на тиждень, раз на два тижня, один раз на місяць, один раз на два місяці, один раз на три місяці та один раз на шість місяців. Антитіло або його фрагмент можуть вводитися безперервно за допомогою мініпомпи або іншим шляхом, таким як імплантована капсула з уповільненим вивільненням, або за допомогою інкапсульована клітина, що продукує антитіло або його фрагмент. Антитіло або його фрагмент можуть бути введені мукозальним, букальним, інтраназальним, інгаляцією, внутрішньовенним, підшкірним, внутрішньом'язовим, парентеральним, інтраокулярним або інтратуморальним шляхом. Антитіло або його фрагмент можуть бути введені один раз, щонайменше двічі або протягом щонайменше період часу проведення лікування, полегшення або зцілення стану. Антитіло або його фрагмент звичайно будуть вводитися доки існує стан. Антитіло або його фрагмент будуть звичайно вводитися як складова фармацевтичної композиції, як описано в даному документі. Дозування антитіла звичайно буде мати значення в діапазоні від 0,1 до 100 мг/кг, від 0,5 до 50 мг/кг, від 1 до 20 мг/кг, та від 1 до 10 мг/кг. Концентрацію у сироватці антитіла або його фрагмента можна виміряти будь-яким придатним способом. Однією ознакою певних сполук, описаних в даному документі, є те, що вони потребують відносно нечастого введення доз, наприклад, один раз на тиждень, два рази на тиждень, три рази на тиждень, один раз на чотири тижня, один раз на два тижня, один раз на 8 тижнів, один раз на 12 тижнів, один раз на 16 тижнів, один раз на 32 тижня, один раз на місяць, один раз на два місяці, один раз на три місяці, або один раз на шість місяців. В деяких випадках, сполуку вводять за потребою, що визначається, наприклад, за станом суб'єкта. Ознакою антагоністів IL-6, описаних в даному документі, що дозволяє проводити відносно нечасте введення доз, є комбінація високої ефективності, яка забезпечується, щонайменше частково, низькою швидкістю дисоціації після зв'язування з IL-6, та можливості доставки відносно високої концентрації сполуки.

В деяких випадках, IL-6a вводять як монотерапію. В інших варіантах реалізації, IL-6a вводять разом з метотрексатом або іншим протиартритним лікарським засобом, що впливає на хворобу.

Одержання антитіл

Антитіло IL-6а або його похідне чи фрагмент може бути одержане з використанням способів, відомих фахівцям, таких як методи моноклональних антитіл (наприклад, див. Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495). Можуть бути використані також інші методики одержання

моноклональних антитіл, такі як вірусна або онкогенна трансформація В-лімфоцитів. Химерні або гуманізовані антитіла можуть бути одержані на основі послідовності мишачого моноклонального антитіла, одержаної з використанням способів, відомих фахівцям. ДНК, що кодує важкий та легкий ланцюги імуноглобуліну, може бути одержана з мишачої гібридоми, що представляє інтерес, та піддана генетичній модифікації для введення не-мишачих (наприклад, людських) послідовностей імуноглобуліну з використанням стандартних методик молекулярної біології. Наприклад, для створення химерного антитіла, мишачі варіабельні ділянки можуть бути з'єднані з людськими константними областями з використанням способів, відомих фахівцям (див. наприклад, патент США № 4816567). Для створення гуманізованого антитіла, мишачі ділянки CDR можуть бути вставлені в людську каркасну ділянку з використанням способів, відомих фахівцям (див. наприклад, патент США № 5225539, та патенти США №№ 5530101; 5585089; 5693762; і 6180370).

У варіантах реалізації, IL-6а, описаний в даному документі (наприклад, антитіло проти IL-6 або його похідне чи фрагмент), може специфічно зв'язувати людський IL-6. У варіантах реалізації, IL-6а може специфічно зв'язуватися із сайтом II IL-6 (наприклад, сайтом II людського IL-6).

В деяких варіантах реалізації, IL-6а антитіло є людським моноклональним антитілом. Такі антитіла можуть бути одержані з використанням трансгенних або трансхромосомних мишей, які містять частини імунної системи людини, а не систему миші. Такі трансгенні та трансхромосомні миші включають "мишей з людським Ig", таких HuMAb Mouse® та KM Mouse® (див., наприклад, патенти США №№ 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; та 5770429; патент США № 5545807; публікації PCT №№: WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 та WO 99/45962; і публікацію PCT № WO 01/14424).

В іншому аспекті, людські антитіла проти IL-6 можуть бути одержані з використанням миші, яка несе послідовності людського імуноглобуліну в трансгенах та трансхромосомах, такої як миша, що несе трансген людського важкого ланцюга та трансхромосому людського легкого ланцюга. Такі миші описані детально в публікації PCT № WO 02/43478.

Інші системи трансгенних тварин, що експресують гени людського імуноглобуліну, є доступними для фахівців і можуть бути використані для одержання антитіла IL-6а. Наприклад, може бути використана альтернативна трансгенна система, називана Xenomouse™ (Abgenix, Inc.); такі миші описані, наприклад, у патентах США №№ 5939598; 6075181; 6114598; 6150584; та 6162963. Крім того, системи трансхромосомних тварин, що експресують гени людського імуноглобуліну, є доступними для фахівців і можуть бути використані для одержання антитіла IL-6а. Наприклад, миші, що несуть як трансхромосому людського важкого ланцюга, так і трансхромосому людського легкого ланцюга, описані у Tomizuka et al. (2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:722-727). Людські моноклональні антитіла також можуть бути одержані з використанням мишей SCID, яким були введені людські імунні клітини, так щоб при імунізації можна було одержати людську гуморальну імунну відповідь. Такі миші описані, наприклад, у патентах США №№ 5476996 та 5698767.

Бібліотеки фагового дисплея

В деяких випадках, антитіло IL-6а антитіло або його похідне чи фрагмент продукують способом, який включає синтез бібліотеки людських антитіл з використанням фага, скринінг бібліотеки з використанням IL-6, наприклад, людського IL-6 або його фрагмента, виділення фага, що зв'язує IL-6, та одержання антитіла з фага.

Рекомбінантне людське антитіло IL-6а також може бути виділене шляхом скринінгу бібліотеки рекомбінантних комбінаторних антитіл. Загалом, бібліотека є бібліотекою фагового дисплея scFv, одержаною з використанням людських κДНК VL та VH, одержаних з мРНК, виділеної з В-клітин. Способи одержання та скринінг таких бібліотек є відомими фахівцям. Набори для створення бібліотек фагового дисплея є комерційно доступними (наприклад, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, № за каталогом 27-9400-01; та набір фагового дисплея Stratagene SurfZAP™, № за каталогом 240612). Інші способи та реагенти, що можуть бути використані для створення та скринінгу бібліотек дисплея антитіл, є відомими фахівцям (див., наприклад, патент США № 5223409; публікації PCT №№ WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., Bio/Technology 9:1370-1372 (1991); Hay et al., Hum Antibod Hybridomas 3:81-85 (1992); Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Griffiths et al., EMBO J 12:725-

734 (1993); Hawkins et al., J Mol Biol 226:889-896 (1992); Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); Gram et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., Bio/Technology 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., Nuc Acid Res 19:4133-4137 (1991); та Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 88:7978-7982 (1991), які усі включені до даного документу шляхом посилання.

У прикладі виділення та продукування людського антитіла IL-6 з бажаними характеристиками, людське антитіло IL-6 спочатку використовують для вибору людських послідовностей важкого та легкого ланцюгів, які мають схожу активність зв'язування по відношенню до IL-6, з використанням методів імпринтингу епітопа, описаних в публікації PCT № WO 93/06213, включеній до даного документу шляхом посилання. Бібліотеки антитіл, використовувані в цьому способі, є звичайно бібліотеками scFv, які готують та піддають скринінгу, як описано у публікації PCT № WO 92/01047; McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); та Griffiths et al., EMBO J 12:725-734 (1993), які усі включені до даного документу шляхом посилання.

Після вибору вихідних людських доменів VL та VH, проводять експерименти "змішування та комбінування" (mix and match), в яких різні пари початково вибраних сегментів VL та VH піддають скринінгу на зв'язування IL-6 з вибраними кращими комбінаціями пар VL/VH. Для вибору бажаної ознаки IL-6а, сегменти VL та/або VH вибраної пари можуть бути випадково мутовані. Таке *in vitro* дозрівання афінності може здійснюватися, наприклад, шляхом ампліфікації доменів VH та VL з використанням ПЛР-праймерів, комплементарних (complimentary) до CDR одного чи обох вибраних доменів VH та VL, де праймери містять випадкову суміш чотирьох нуклеотидних основ в певних положеннях, так щоб одержані продукти ПЛР кодували сегменти VH та VL з випадковими мутаціями, введеними в VH та/або VL. Такі випадково мутовані сегменти VH та VL можуть бути піддані повторному скринінгу на зв'язування з IL-6, наприклад, із сайтом II IL-6.

Після скринінгу та виділення антитіла IL-6а з бібліотеки рекомбінантного імуноглобулінового дисплея, нуклеїнові кислоти, що кодують вибране антитіло, можуть бути виділені з набору дисплея (наприклад, з фагового геному) та субклоновані в інші експресійні вектори з використанням методів рекомбінантних ДНК, відомих фахівцям. Такі антитіла можуть бути додатково піддані маніпуляціям з метою одержання фрагмента антитіла, такого як описаний в даному документі.

Фармакокінетика (PK)

Тестування з метою визначення фармакокінетики (PK) може бути проведене з використанням способів, описаних в даному документі, і/або способів, відомих фахівцям. Однією з перешкод при визначеннях, що потребують використання тварин, наприклад, при визначенні фармакокінетики (PK), є те, що людський IL-6 має менше 50 % гомології з IL-6 деяких тварин, звичайно використовуваних для такого тестування. Тому один спосіб тестування фармакокінетики полягає у використанні трансгенних мишей, що експресують людський IL-6. В деяких варіантах реалізації, для визначення фармакокінетики використовують примата, який не є людиною.

В деяких варіантах реалізації, антитіло проти IL6 є мутованим для зміни його фармакокінетики, наприклад, шляхом зміни чутливості зв'язування з FcRn до pH. Спосіб одержання таких мутацій описаний у прикладах. Відповідно, в деяких варіантах реалізації, IL-6а має змінену системну фармакодинаміку у порівнянні з батьківським IL-6а або референсною молекулою. В деяких випадках, фармакодинаміка у склистому тілі не є зміненою або поліпшеною. В деяких варіантах реалізації, IL-6а має знижені показники системної фармакодинаміки (наприклад, зменшений період напіввиведення і/або підвищений кліренс, наприклад, за результатами визначення у циркулюючій рідині, такої як кров, плазма, лімфа або сироватка) у порівнянні з батьківським IL-6а або референсною молекулою.

Моделі для тестування антагоніста IL-6

Антагоністи IL-6 можуть бути протестовані на моделях хвороби на доставку, асоційовану з IL-6, зокрема, на ефективність лікування та обмежені шкідливі ефекти на кращі властивості IL-6. Наприклад, тестування для увеїту може бути проведене на експериментальній аутоімунній моделі увеїту на щурах або мишах (Caspí, Invest Ophthalmol Vis Sci 52:1873; Agarwal et al., 900:443-69, 2012) з використанням міжфоторецепторного ретиноїдзв'язуючого білка (IRBP) для імунізації в повному ад'юванті Фрейнда (CFA). Інші моделі включають відомі фахівцям моделі індукованого дендритними клітинами увеїту, адоптивного перенесення культивованих ефекторних Т-клітин, спонтанного експериментального аутоімунного увеїту (EAU) у IRBP TCR Tg-мишей, ендотоксин-індукованого увеїту, аутоімунного увеоретиніту (Haruta et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 53:3264 (2011); Yoshimura et al., Rheumatology 48:347-354 (2009)).

Іншими модельними системами, що можуть бути використані для вивчення ефектів IL-6а

при лікуванні хвороби, асоційованої з IL-6, є, наприклад, модель хоріоїдальної неоваскуляризації (ХНВ) (Izumi-Nagai et al., Am J Pathol 170:6 (2007); Krzystolik et al., Arch Ophthalmol 120:338 (2002)) та діабетичні моделі, такі як описані у Kern et al. (Animal Models Of Diabetic Complications Consortium (P01 DK57733), Update Report (September 2001 – January 2004)). Тваринні моделі, придатні для тестування IL-6а при ревматоїдному артриті, є відомими фахівцям, наприклад, див. Asquith et al. (Eur J Immunol 39:2040-4 (2009)) та Kollias et al. (Ann Rheum Dis 70:1357-62 (2011)).

ХНВ-моделі є репрезентативними, наприклад, для людських станів ВМД та ДМН. Моделі неоваскуляризації сітківки є корисними, наприклад, для вивчення ішемічних ретинопатій, наприклад, діабетичної ретинопатії або ретинопатії недоношених. Різні моделі хоріоїдальної та ретинальної неоваскуляризації є відомими фахівцям (див., наприклад, Grossniklaus, H.E. et al. Prog Retin Eye Res. 2010 Nov; 29(6):500-19. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.05.003. Epub 2010 May 19; Saisin, Y et al. (2003) Journal of Cellular Physiology, 195:241-248; Takahashi, K. et al. (2003) Investigative Ophthalmology & Visual Science, 44(1):409-415; Lima e Silva, R. et al. (2007) FASEB Journal, 21:3219-3230; Tobe et al. (1998) American Journal of Pathology, 153(5):1641-1646; Dong, A et al. (2011) PNAS, 108(35): 14614-14619; Dong et al. (2009) J Cell Physiol 219:544-552; Smith, LE et al. 1994 Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35:101-111; Shen, J. et al. (2007) Investigative Ophthalmology & Visual Science, 48(9):4335-4341) і можуть бути використані для дослідження ефективності IL-6а. Хоріоїдальна неоваскуляризація (ХНВ) може бути індукована, наприклад, лазерами, світлом, хірургічно, або шляхом генетичної модифікації. Моделі індукованої киснем ретинальної неоваскуляризації є відомими фахівцям та описані, наприклад, у Smith, LE et al. 1994 Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35:101-111; Shen, J. et al. (2007) Investigative Ophthalmology & Visual Science, 48(9):4335-4341.

Може бути використана також модель ішемії/реперфузії. Див., наприклад, Zheng, L et al. Investigative Ophthalmology & Visual Science, vol. 48 № 1 pp. 361-367, 2007. Наприклад, в День 1, голку калібру 30, приєднану до пакету з рідиною, вводять в рогівку анестезованих мишей та внутрішньоочний тиск (БОТ) підвищують до приблизно 120 мм рт.ст. для створення ішемії. Через 30-90 хвилин, голку видаляють, БОТ нормалізується, і відбувається зворотна ретинальна циркуляція. Експресія запальних маркерів, включаючи TNF- α та ICAM-1, може бути оцінена методом вестерн-блотинга та кількісної ПЛР (кПЛР) в День 2-6. Додатково, втрату гангліозних клітин можна оцінити шляхом гістології в День 3-14, а дегенерацію капілярів вимірюють методом гідролізу трипсином в День 10-14. Для терапевтичних досліджень, досліджуваний препарат (наприклад, 1 мкл IL6а з придатною концентрацією, наприклад, 20 мг/мл) вводять ін'єкцією інтравітреально незадовго до або після індукування ішемії.

Комбіновані терапії

В деяких варіантах реалізації, IL-6а вводять в комбінації з другим терапевтичним засобом. Наприклад, IL-6а вводять у схемі лікування, що включає інгібітор VEGF, такий як, наприклад, ранібізумаб. В деяких варіантах реалізації, IL-6а вводять у схемі лікування, що включає інгібітор PDGF, такий як, наприклад, антитіло проти PDGF або антитіло проти рецептора PDGF (наприклад, іматиніб). В деяких варіантах реалізації, IL-6а вводять в комбінації з інгібітором шляху комплементу, наприклад, лампалізумабом (інгібітор фактора D) або інгібітором C5.

Доставка антагоніста IL-6

Антагоніст IL-6 або композиція, описані в даному документі, можуть бути доставлені місцево, з прямим контактом з, або поблизу до, клітин або тканини, призначених для інгібування IL-6. Необмежувальні приклади таких способів доставки включають ін'єкцію, інфузію або імплантацію речовини, що містить антагоніст IL-6.

У варіантах реалізації, IL-6а або композицію вводять внутрішньоочно, наприклад, інтравітреально, наприклад, шляхом інтравітреальної ін'єкції, офтальмологічної вкладки, або генетичної доставки.

В деяких варіантах реалізації, композицію IL-6а вводять у вигляді офтальмологічної композиції. Способи можуть включати введення композиції IL-6а та офтальмологічно прийняттого носія. В деяких варіантах реалізації, офтальмологічна композиція є рідиною, напівтвердою речовиною, вкладкою, плівкою, мікрочастинками або наночастинками. Композиція IL-6а може бути введена, наприклад, місцево або шляхом ін'єкції (наприклад, інтравітреальної ін'єкції).

В деяких варіантах реалізації, композицію IL-6а складають для інтравітреального введення.

В деяких варіантах реалізації, композицію IL-6а складають для місцевого введення, наприклад, в око. Композиція для місцевого введення може бути рідкою композицією або напівтвердою, наприклад, композиція для місцевого введення може включати водний розчин, водну суспензію, рідку мазь або гель. Офтальмологічна композиція IL-6а можуть бути місцево

нанесена на передню частину ока, під верхнє віко, на нижнє віко та в сліпий мешок (cul-de-sac). Типово, офтальмологічна композиція є стерильною. Офтальмологічна композиція IL-6a може містити один чи декілька фармацевтичних ексципієнтів, придатних для приготування офтальмологічних композицій. Прикладами таких ексципієнтів є консерванти, буферні агенти, хелатуючі агенти, антиоксиданти та солі для регулювання осмотичного тиску. Офтальмологічні композиції, включаючи як рідкі мазі, так і суспензії, типово мають в'язкість, придатну для вибраного шляху введення. В деяких варіантах реалізації, офтальмологічна композиція має в'язкість від приблизно 1000 до приблизно 30000 сантипуаз.

В деяких варіантах реалізації, композиція є рідкою композицією, що містить полімер. Такий полімер може бути використаний для поліпшення біодоступності, підвищення в'язкості, або зниження відтоку з ока рідкої композиції. Придатні полімери включають, без обмеження, описані у Wagh et al. (Asian J Pharm, 2:12-17, 2008). В необмежувальних прикладах, полімер є гіалуроною натрію, хітозаном, циклодекстрином (наприклад, гідроксипропіл- β -циклодекстрином), полігалактуроною (polygalacturonic) кислотою, ксилотріозою, ксантановою камеддю, желатиною камеддю, тіомером (thiomer), полі(ортофосфатом) (наприклад, Einmahl, Adv Drug Deliv Rev 53:45-73, 2001), або полісахаридом насіння тамаринду (наприклад, Ghelardi et al., Antimicrob Agents Chemother 48:3396-3401, 2004).

В деяких варіантах реалізації, композиція, що містить композицію IL-6a для офтальмологічної доставки, може включати один чи декілька з поверхнево-активних речовин, ад'ювантів, буферів, антиоксидантів, регуляторів тоничності, консервантів (наприклад, ЕДТА, БАХ (бензалконію хлорид), хлорит натрію, перборат натрію, полікватерній-1), загусників або модифікаторів в'язкості (наприклад, карбоксиметилцелюлоза, гідроксиметилцелюлоза, полівініловий спирт, поліетиленгліколь, гліколь 400, пропіленгліколь гідроксиметилцелюлоза, гідроксипропілгуар, гіалуронова кислота, та гідроксипропілцелюлоза) тощо. Додатки до композиції можуть включати, без обмеження, хлорид натрію, бікарбонат натрію, сорбінова кислота, метилпарабен, пропілпарабен, хлоргексидин, касторова олія, та перборат натрію.

В деяких варіантах реалізації, в композиції використовують очищену або деіонізовану воду. рН може бути встановлена шляхом додавання будь-яких фізіологічно та офтальмологічно прийнятних додатків для регулювання рН кислот, основ або буферів в діапазоні значень приблизно від 5,0 до 8,5, наприклад, рН 7,0, рН 7,3, рН 7,4, або рН 7,5. Офтальмологічно прийнятні приклади кислот включають оцтову, борну, лимонну, молочну, фосфорну, хлористоводневу тощо, і приклади основ включають гідроксид натрію, фосфат натрію, борат натрію, цитрат натрію, ацетат натрію, лактат натрію, трометамін, трисгідроксиметиламінометан тощо. Приклади солей та буферів, що можуть бути використані в композиції, включають цитрат/декстрозу, бікарбонат натрію, хлорид амонію та суміші вищевказаних кислот та основ.

В деяких варіантах реалізації, осмотичний тиск офтальмологічної композиції може складати від приблизно 10 мОсм (мОсм) до приблизно 400 мОсм, наприклад, від 200 до 400 мОсм, або від 220 до 370 мОсм. Звичайно, осмотичний тиск можна відрегулювати за допомогою фізіологічно та офтальмологічно прийнятних солей або ексципієнтів. В деяких варіантах реалізації, композиція включає хлорид натрію, наприклад, хлорид натрію є присутнім в композиції в діапазоні концентрацій від 0,01 % до 1 % мас., або від 0,05 % до 0,45 % мас., від загальної ваги композиції. Для досягнення осмолярності в бажаному діапазоні значень на додаток до або замість хлориду натрію можуть бути використані також еквівалентні кількості однієї чи декількох солей, що складаються з катіонів, таких як калій, амоній тощо, та аніонів, таких як хлорид, цитрат, аскорбат, борат, фосфат, бікарбонат, сульфат, тіосульфат, бісульфат, бісульфат натрію, сульфат амонію тощо. В деяких варіантах реалізації, для встановлення осмолярності також використовують цукор, такий як маніт, декстроза, сорбіт, глюкоза тощо.

В деяких варіантах реалізації, способи передбачають створення або введення депо агента, яке перебуває в контакт з зовнішньою поверхнею ока. Депо стосується джерела агента, яке не видаляється швидко сльозами або іншими механізмами кліренсу ока. Це дозволяє забезпечувати безперервно підтримувані високі концентрації агента, присутнього в рідині на зовнішній поверхні ока при разовому застосуванні. В деяких варіантах реалізації, депо може залишатися протягом періоду до восьми годин чи більше. В деяких варіантах реалізації, офтальмологічна композиція депо включає, без обмеження, водні полімерні суспензії, рідкі мазі та тверді вкладки.

В деяких варіантах реалізації, напівтверда композиція є рідкою композицією, в'язкість якої зростає після застосування в оці, типово через присутність у рідкій композиції полімеру, для якого зростання в'язкості відбувається при зміні температури, рН або концентрації електроліту. Полімер може бути, наприклад, ацетофталат целюлози, поліакрилова кислота, желатинова камедь, гіалуроноза, хітозан, солі альгінової кислоти (наприклад, альгінат натрію), або блок-

співполімер етиленоксиду та пропіленоксиду (наприклад, плуронік (Pluronic®), BASF; полуксамер). В деяких варіантах реалізації, поліакрилова кислота є зшитою акриловою кислотою (наприклад, карбопол (Carbopol®)). В деяких варіантах реалізації, напівтверда композиція містить суміш карбополу та блок-співполімеру етиленоксиду та пропіленоксиду; суміш метилцелюлози та гідроксіетилцелюлози; або суміш поліетиленгліколю та блок-співполімеру етиленоксиду та пропіленоксиду.

В деяких варіантах реалізації, офтальмологічна композиція, що містить IL-6a, є рідкою маззю або гелем. В деяких варіантах реалізації, офтальмологічна композиція є засобом доставки на масляній основі. Наприклад, композиція може включати вуглеводневу (petroleum) або ланолінову основу, до якої додають композицію IL-6a (наприклад, в кількості від 0,1 до 2 %), та ексципієнти. Звичайні основи можуть включати, без обмеження, мінеральне масло, вазелін та їх комбінації. В деяких варіантах реалізації, рідку мазь наносять у вигляді смужки на нижнє віко.

В деяких випадках, офтальмологічна композиція є офтальмологічною вкладкою. У варіантах реалізації, композицію вводять інтравітреально за допомогою офтальмологічної вкладки.

Наприклад, офтальмологічна вкладка є біологічно інертною, м'якою, біоеродованою, в'язкопружною, стабільною при стерилізації після обробки терапевтичними агентами, стійкою до інфекцій бактеріями, переносимими у повітрі, біоеродованою, біосумісною та/або в'язкопружною. В деяких варіантах реалізації, вкладка включає офтальмологічно прийнятну матрицю, наприклад, полімерну матрицю. Матриця типово є полімером і композиція IL-6a диспергується усередині матриці або зв'язується з полімерною матрицею. В деяких варіантах реалізації, агент повільно вивільняється з матриці шляхом розчинення або гідролізу ковалентного зв'язку. В деяких варіантах реалізації, полімер є біоеродованим (розчинним) і його швидкість розчинення може контролювати швидкість вивільнення диспергованого в ньому агента. В іншій формі, полімерна матриця є біодеградованим полімером, який руйнується, наприклад, гідролізом, тим самим вивільняючи зв'язаний з ним або диспергований в ньому агент. В додаткових варіантах реалізації, матриця та агент можуть бути оточені додатковим полімерним покриттям для додаткового контролю вивільнення. В деяких варіантах реалізації, вкладка включає біодеградований полімер, такий як полікапролактон (ПКЛ), співполімер етилену/вінілацетату (EVA), поліалкілціаноакрилат, поліуретан, найлон або полі(dl-лактід-ко-гліколід) (PLGA), або співполімер будь-чого із зазначеного. В деяких випадках, агент диспергують в матеріалі матриці, або диспергують в мономерній композиції, використовуваний для виготовлення матеріалу матриці, до полімеризації. В деяких варіантах реалізації, кількість агента складає від приблизно 0,1 до приблизно 50 %, або від приблизно 2 до приблизно 20 %. Біодеградована або біоеродована полімерна матриця може бути використана так, щоб відпрацьовану вкладку не треба було видаляти з ока. По мірі деградації або розчинення біодеградованого або біоеродованого полімеру, агент вивільняється.

В додаткових варіантах реалізації, офтальмологічна вкладка включає полімер, включаючи, без обмеження, описані в Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems", Asian J. Pharm., pages 12-17 (January 2008), яка включена до даного документу шляхом посилання в повному обсязі. В деяких варіантах реалізації, вкладка включає полімер, вибраний з полівінілпіролідону (PVP), акрилатного або метакрилатного полімеру або співполімеру (наприклад, сімейство полімерів Eudragit® виробництва Rohm або Degussa), гідроксиметилцелюлози, поліакрилова кислота, полі(амідоамін) дендримери, полі(диметилсилоксан), поліетиленоксид, полі(лактід-ко-гліколід), полі(2-гідроксіетилметакрилат), полівініловий спирт), або полі(пропіленфумарат). В деяких варіантах реалізації, вкладка включає Gelfoam®. В деяких варіантах реалізації, вкладка є кон'югатом поліакрилової кислоти 450 кДа-цистеїну.

Вкладка може включати серцевину, яка містить композицію IL-6a та зовнішню трубку (наприклад, як описано в публікації патенту США № 20040009222). В деяких випадках, зовнішня трубка може бути проникною, напівпроникною, або непроникною для лікарського засобу. В деяких варіантах реалізації, серцевина включає полімерну матрицю, яка не має значного ефекту на швидкість вивільнення композиції IL-6a. В деяких випадках, зовнішня трубка, полімерна матриця серцевини, або обидві, є біоеродованими. Коекструдований продукт може бути сегментованим на засоби доставки ліків. В деяких варіантах реалізації, засіб не має покриття, так щоб його відповідні кінці були відкритими, або засіб покритий, наприклад, шаром, що є проникним для композиції IL-6a, напівпроникним для композиції IL-6a, або біоеродованим. В певних варіантах реалізації, композиція IL-6a та щонайменше один полімер змішуються в порошкоподібній формі.

В деяких варіантах реалізації, офтальмологічна композиція є офтальмологічною плівкою.

Полімери, придатні для таких плівок, включають, без обмеження, описані в Wagh, et al. (supra). В деяких варіантах реалізації, плівка є м'якою контактною (contract) лінзою, наприклад, лінзою, що складається з співполімерів N, N-діетилакриламід та метакрилової кислоти, зшитих етиленглікольдиметакрилатом.

5 В певних варіантах реалізації, IL-6a розташований у вкладці, яка має трубчасту форму, і може бути сегментованою.

В деяких варіантах реалізації, композиція IL-6a складається з терапевтично ефективної кількості, з покриттям з, або диспергованою в, полімерній матриці, так щоб композиція IL-6a мала гранульовану або дисперсну форму. В деяких варіантах реалізації, композиція IL-6a вивільняється з лікарського засобу по мірі того, як лікарська речовина з гранул розчиняється в або усередині матриці, дифундує через матрицю, та вивільняється в навколишню фізіологічну рідину. В деяких варіантах реалізації, швидкість вивільнення обмежена переважно швидкістю розчинення композиції IL-6a з гранул/частинок в матриці; стадії дифузії через матрицю та диспергування у навколишній рідині переважно не обмежують швидкості вивільнення. В певних
15 варіантах реалізації, полімерна матриця є не-біоеродованою, у той час як в інших варіантах реалізації вона є біоеродованою. Типові приклади не-біоеродованих полімерних матриць можуть бути сформовані з поліуретану, полісилікону, полі(етилен-ко-вінілацетату) (EVA), полівінілового спирту та їх похідних та співполімерів. Типові приклади біоеродованих полімерних матриць можуть бути сформовані з поліангідриду, полімолочної кислоти, ролугліколевої кислоти, поліортоєфіру, поліалкілціаноакрилату, та їх похідних і співполімерів.
20

В деяких випадках, композиція IL-6a виготовлена з колагенового матеріалу. Наприклад, вкладка може бути розчинною вкладкою з офтальмологічним лікарським засобом (наприклад, овальною полімерною плівкою, яка може бути введена в верхній кон'юнктивальний мішок для доставки лікарського засобу; еліптичною вкладкою, такою як OCUSER® (очна терапевтична система з пілокарпіном, розроблена Alza Corporation), виготовлена з етилену-вінілацетату; Lacrisert®, вкладка у формі стрижня, виготовлена з целюлози; нові системи доставки офтальмологічних лікарських засобів (NODS), виготовлені з полі(вінілового спирту); або вкладки, такі як описані у Fabrizio (Adv Drug Deliv Rev 16: 95-106, 1998). В деяких випадках, вкладка включає колаген, желатин або полімер, причому полімер вибирають з полікапролактону (ПКЛ), співполімеру етилену/вінілацетату (EVA), поліалкілціаноакрилату, поліуретану, найлону, полі-(dl-лактиду-ко-гліколіду) (PLGA), або співполімеру будь-чого із зазначеного. В деяких випадках, вкладка імплантується під верхнє віко. В деяких випадках, вкладка імплантується в задній сегмент ока, в хоріоїдальний простір, або в склеру. В деяких варіантах реалізації, вкладка імплантується інтравітреально або субретинально. В деяких варіантах реалізації, вкладку вводять ін'єкцією субретинально. Способи введення та методики їх одержання викладені в Remington's: The Practice of Science of Pharmacy, 20th edition (Lippincott Williams & Wilkins, 2006), яка включена до даного документу шляхом посилання в повному обсязі.
30

В інших варіантах реалізації, вкладка, що містить композицію IL-6a, забезпечує уповільнене вивільнення агента в склисте тіло ока. У використовуваному в даному документі значенні, "уповільнене вивільнення" означає, що композиція вивільняє агент контрольовано протягом тривалого періоду часу. В деяких варіантах реалізації, вкладка вивільняє агент з такою швидкістю, щоб водна концентрація агента залишалася менше концентрації агента у склистому тілі в процесі вивільнення. В деяких варіантах реалізації, водна концентрація агента становить від приблизно 0,002 мкг/мл до приблизно 0,01 мкг/мл або від приблизно 0,01 мкг/мл, до
45 приблизно 0,05 мкг/мл, або менш ніж приблизно 0,05 мкг/мл. В деяких варіантах реалізації, агент вивільняється зі швидкістю від приблизно 1 мкг/день до приблизно 50 мкг/день, або від приблизно 1 мкг/день до приблизно 10 мкг/день. В деяких варіантах реалізації, вкладка додатково містить додатковий терапевтичний агент, як описано вище, наприклад, флуоцинолон ацетонід (такий як використовуваний в офтальмологічній вкладці Retisert®).
50

В деяких варіантах реалізації, офтальмологічна композиція включає мікросфери або наночастинки. В деяких варіантах реалізації, мікросфери включають желатин. В деяких варіантах реалізації, мікросфери вводять ін'єкцією в задній сегмент ока, у хоріоїдальний простір, в склеру, інтравітреально або субретинально. В деяких варіантах реалізації, мікросфери або наночастинки містять полімер, включаючи, без обмеження, описані в Wagh, et al. (Asian J Pharm 2:12-17, 2008). В деяких варіантах реалізації, полімер є хітозаном, полікарбоновою кислотою, такою як поліакрилова кислота, альбумінові частинки, складні ефіри гіалуронової кислоти, поліітаконова кислота, полі(бутил)ціаноакрилат, полікапролактон, полі(ізобутил)капролактон, полі(молочна кислота-ко-гліколева кислота), або полі(молочна кислота). В деяких варіантах реалізації, мікросфери або наночастинки включають тверді ліпідні частинки.
55

60 В деяких варіантах реалізації, композиція IL-6a включає іонообмінну смолу. В деяких

варіантах реалізації, іонообмінна смола є неорганічним цеолітом або синтетичною органічною смолою. В деяких варіантах реалізації, іонообмінна смола включає, без обмеження, описані в Wagh, et al., supra, яка включена до даного документу шляхом посилання в повному обсязі. В деяких варіантах реалізації, іонообмінна смола є частково нейтралізованою поліакриловою кислотою.

Композиція IL-6a може бути одержана у вигляді водної полімерної суспензії. В деяких варіантах реалізації, композицію IL-6a або полімерний суспендувальний агент суспендують у водному середовищі (наприклад, з властивостями, описаними вище). Приклади полімерних суспендувальних агентів включають, без обмеження, декстрини, поліетиленгліколи, полівінілпіролідон, полісахаридні гелі, Gelrite®, целюлозні полімери, такі як гідроксипропілметилцелюлоза, та карбоксилвмісні полімери, такі як полімери або співполімери акрилової кислоти, а також інші полімерні речовини, що знижують подразнення. В деяких варіантах реалізації, полімерний суспендувальний агент є нерозчинним у воді полімером який, набухає у воді, особливо, зшитим карбоксилвмісним полімером. В деяких варіантах реалізації, полімерний суспендувальний агент включає від щонайменше приблизно 90 % до приблизно 99,9 %, або від приблизно 95 % до приблизно 99,9 % мас., від загальної ваги присутніх мономерів, одного чи декількох карбоксилвмісних моноетиленненасичених мономерів. В деяких варіантах реалізації, карбоксилвмісний моноетиленненасичений мономер включає акрилову кислоту, метакрилову кислоту, етакрилову кислоту, метилакрилову кислоту (кротонову кислоту), цис-альфа-метилкротонову кислоту (ангелікову кислоту), транс-α-метилкротонову кислоту (тиглінову кислоту), α-бутилкротонову кислоту, альфа-фенілакрилову кислоту, α-бензилакрилову кислоту, α-циклогексилакрилову кислоту, фенілакрилову кислоту (коричну кислоту), кумарову кислоту (o-гідроксикоричну кислоту) та умбелову кислоту (p-гідроксикумарову кислоту). В деяких варіантах реалізації, полімер є зшитим за допомогою поліфункціонального зшивального агента (наприклад, дифункціонального зшивального агента). В деяких варіантах реалізації, вміст зшивального агента становить від приблизно 0,01 % до приблизно 5 %, або від приблизно 0,1 % до приблизно 5,0 %, або від приблизно 0,2 % до приблизно 1 %, від загальної ваги присутніх мономерів. В деяких варіантах реалізації, зшивальні агенти є не-поліалкенільними поліефірними дифункціональними зшивальними мономерами, такими як дивінілгліколь, 2,3-дигідроксигекса-1,5-дієн, 2,5-диметил-1,5-гексадієн, дивінілбензол, N, N-діалілакриламід, N, N-діалілметакриламід; поліалкенільними поліефірними зшивальними агентами, що містять дві чи більше алкенільні прості ефірні групи на молекулу, наприклад, алкенільні прості ефірні групи, які містять кінцеві групи $H_2C=C$, одержаними шляхом етерифікації багатоатомного спирту, що містить щонайменше чотири атоми вуглецю та щонайменше три гідроксильні групи, алкенілгалогенідом, таким як алілбромід тощо, наприклад, поліалілсахарозою, поліаліллпентаеритритом тощо; діолефіновими не-гідрофільними макромерними зшивальними агентами, що мають молекулярну вагу від приблизно 400 до приблизно 8000, такими як нерозчинні діакрилати та поліакрилати і метакрилати діолів та поліолів, діізоціанатгідроксильні акрилатні або -метакрилатні продукти реакції преполімерів з кінцевими ізоціанатними групами, похідними від складних поліефірдіолів, простих поліефірдіолів або полісилоксандіолів, з гідроксильними метакрилатами тощо.

В деяких варіантах реалізації, зшиті полімери одержують з карбоксилвмісного моноетиленненасиченого мономера або мономерів як єдиного присутнього моноетиленненасиченого мономера, разом із зшивальним агентом або агентами. В деяких варіантах реалізації, полімери є такими, у яких до приблизно 40 %, і краще, від приблизно 0 % до приблизно 20 % мас., карбоксилвмісного моноетиленненасиченого мономера або мономерів було заміщено на один чи декілька не-карбоксилвмісних моноетиленненасичених мономерів, що містять тільки фізіологічно та офтальмологічно нешкідливі замісники, включаючи складні ефіри акрилової та метакрилової кислот, такі як метилметакрилат, етилакрилат, бутилакрилат, 2-етилгексилакрилат, октилметакрилат, 2-гідроксietилметакрилат, 3-гідроксипропілакрилат тощо, вінілацетат, N-вінілпіролідон тощо (наприклад, Mueller et al., патент США № 4548990). В деяких варіантах реалізації, полімери включають полікарбофіл (Noveon AA-1), карбопол (Carbopol®), та DuraSite®. В деяких варіантах реалізації, зшиті полімери одержують суспензійною або емульсійною полімеризацією мономерів, з використанням звичайних каталізаторів вільнорадикальної полімеризації, з розміром частинок у сухому стані не більш ніж приблизно 50 мкм за еквівалентним сферичним діаметром. В деяких варіантах реалізації, середній розмір частинок у сухому стані становить від приблизно 1 до приблизно 30 мкм, або від приблизно 3 до приблизно 20 мкм за еквівалентним сферичним діаметром. В деяких варіантах реалізації, полімерні частинки одержують шляхом механічного помелу більших за розміром полімерних частинок. В додаткових варіантах реалізації, такі полімери будуть мати

молекулярну вагу від приблизно 250000 до приблизно 4000000, і від 3000000000 до 4000000000. В інших варіантах реалізації, частинки зшитого полімеру є монодисперсними, тобто, вони мають такий розподіл частинок за розміром, щоб щонайменше приблизно 80 %, приблизно 90 % або приблизно 95 %, частинок потрапляли до мікронної смуги широкого розподілу частинок за розміром. В додаткових варіантах реалізації, монодисперсний розмір частинок означає, що не більш ніж приблизно 20 %, приблизно 10 %, або приблизно 5 % частинок мають розмір менше 1 мкм. В деяких варіантах реалізації, водна полімерна суспензія включає від приблизно 0,05 до приблизно 1 %, від приблизно 0,1 до приблизно 0,5 %, або від приблизно 0,1 до приблизно 0,5 %, агента, та від приблизно 0,1 до приблизно 10 %, від приблизно 0,5 до приблизно 6,5 %, від приблизно 0,5 до приблизно 2,0 %, від приблизно 0,5 % до приблизно 1,2 %, від приблизно 0,6 до приблизно 0,9 %, або від приблизно 0,6 до приблизно 0,8 %, полімерного суспендувального агента. Хоча він згадується в однині, слід розуміти, що один чи декілька видів полімерного суспендувального агента можуть бути використані, причому їх загальна кількість відповідає вказаним діапазонам значень. В одному варіанті реалізації, кількість нерозчинних слабозшитих полімерних частинок, величина рН, та осмотичний тиск можуть корелювати між собою та зі ступенем зшивання, для одержання композиції, яка має в'язкість в діапазоні від приблизно 500 до приблизно 100000 сантипуаз, і краще від приблизно 1000 до приблизно 30000, або від приблизно 1000 до приблизно 10000 сантипуаз, вимірювану при кімнатній температурі (близько 25 °C) з використанням віскозиметра Brookfield Digital LVT, обладнаного шпінделем № 25 та адаптором для малих зразків 13R, при 12 об/хв. В деяких варіантах реалізації, в'язкість становить від приблизно 10 до приблизно 400 сантипуаз, від приблизно 10 до приблизно 200 сантипуаз, або від приблизно 10 до приблизно 25 сантипуаз.

В деяких варіантах реалізації, водні полімерні суспензії можуть бути складені таким чином, щоб вони зберігали таку саме або по суті таку саме в'язкість в оці, як та, що вони мали до введення в око. В деяких варіантах реалізації, вони можуть бути складені таким чином, щоб при контакті зі слізною рідиною відбувалося посилене гелеутворення. Наприклад, коли композицію, що містить DuraSite® або інший подібний полімер типу поліакрилової кислоти, вводять в око при рН менш ніж приблизно 6,7, полімер може набухати при контакті зі слізною рідиною, оскільки він має більш високий рН (близько 7). Це гелеутворення або посилення гелеутворення може приводити до захоплення суспендованих частинок, тим самим збільшуючи час перебування композиції в оці. В деяких варіантах реалізації, агент повільно вивільняється по мірі розчинення суспендованих частинок протягом тривалого часу. В деяких варіантах реалізації, цей шлях доставки підвищує відчуття комфорту у пацієнта та збільшує час контакту агента з тканинами ока, тим самим підвищуючи ступінь абсорбції лікарського засобу та тривалість дії композиції в оці. Агенти, які містять ці системи доставки лікарського засобу, будуть вивільнятися з гелів зі швидкостями, що залежать від таких факторів, як власне лікарський засіб та його фізична форма, вміст активної речовини в препараті та величина рН системи, а також від будь-яких ад'ювантів, використовуваних для доставки лікарського засобу, таких як іонообмінні смоли, сумісні з поверхнею ока, які також можуть бути присутніми.

В деяких варіантах реалізації, антагоніст IL-6 надається суб'єкту з використанням генетичної доставки, наприклад, місцевої генетичної доставки. Така доставка може здійснюватися за допомогою транз'єнтної експресійної системи, стабільної (наприклад, інтегрованої) експресійної системи, такої як лентивірусна система доставки виробництва фірми Bluebird Bio (Cambridge, MA), або доставки в клітинній фабриці, такій як ті, що виробляються фірмою Neurotech (Cumberland, Rhode Island).

Усі технічні ознаки можуть бути індивідуально поєднані в усіх можливих комбінаціях таких ознак.

ЕКВІВАЛЕНТИ

Винахід може бути втілений в інших конкретних формах без виходу за межі його суті або суттєвих характеристик. Вищевказані варіанти реалізації тому мають вважатися в усіх відношеннях ілюстративними, а не обмежувачими винахід, описаний в даному документі.

ПРИКЛАДИ

Наведені далі необмежувальні приклади додатково ілюструють варіанти реалізації винахідів, описаних в даному документі.

Приклад 1: Підтвердження місцевої блокади IL-6 у моделі хоріоїдальної неоваскуляризації (ХНВ)

Для визначення того, чи може місцева блокада IL-6 бути ефективною для лікування хвороби ока, наприклад, діабетичного макулярного набряку (ДМН) або вологого ВМД, антитіло проти IL-6 було місцево введено з використанням модельної системи хоріоїдальної неоваскуляризації. Індукована лазером модель ХНВ (eyecro.com/in-vivo/laser-induced-choroidal-neovascularization-

снv/) відтворює багато патологічних процесів, що лежать в основі ДМН, включаючи запалення та ангиогенез. Дослідження проводили на щурах в EyeCRO (Oklahoma City, OK). Шести тваринам в кожній групі проводили двобічну лазерну обробку в День 0 для створення трьох уражень на око. В дні 3 та 10, 3 мкг поліклонального антищурячого антитіла IL-6 (R&D Systems AF506; Minneapolis, MN) вводили тестованій групі інтравітреальною (IVT) ін'єкцією, у той час як фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) або поліклональне антитіло проти VEGF (R&D Systems AF564) вводили групам носія та позитивного контролю, відповідно. In vivo ангиографію проводили в дні 15 та 22 з метою вимірювання площі ураження. В дні 15 та 22, група, що отримувала засіб проти IL-6, мала значно знижену неоваскуляризацію у порівнянні з контрольним носієм. Не спостерігали значної різниці у відповіді між групою, що отримувала засіб проти IL-6, та позитивним контролем із засобом проти VEGF. Фіг. 1 показує результати такого експерименту. Ці дані демонструють, що IL-6а, наприклад, антитіло проти IL6, введений інтравітреально (IVT), може знижувати неоваскуляризацію в щурячій моделі ХНВ до рівнів, близьких до позитивного контролю із засобом проти VEGF ($p=0,0054$ в День 15 та $p=0,0005$ в День 22 для засобу проти IL-6 порівняно з контрольним носієм).

Ці дані показують, що місцева блокада IL-6 може бути придатною для лікування хвороб ока, таких як хвороби, пов'язані із судинним просочуванням, наприклад, макулярного набряку.

Приклад 2: Кандидати-антагоністи антитіла IL-6

Кандидати-антагоністи антитіла IL-6 були розроблені з використанням процесу, який починається з імунізації. Імунізації проводила за вказівками авторів винаходу контрактна дослідницька організація (CRO). П'яти мишам BALB/C вводили ін'єкцією підшкірно 80 мкг людського IL-6 (R&D Systems, № за каталогом 206-IL/CF, Minneapolis, MN) в ФСБ, що містить 1 М NaCl з ад'ювантом Фрейнда (Freud). Робили дві бустерні ін'єкції 80 мкг та 50 мкг IL-6. У мишей з найвищим титром брали клітини селезінки та зливали з клітинами міеломи P3 × 763Ag8.653 для утворення гібридом.

Супернатанти гібридом піддавали скринінгу на зв'язування IL-6 та антагонізм. Для проведення аналізу зв'язування методом ELISA (твердофазового імуоферментного аналізу), планшети Costar 9018 покривали 1 мкг/мл людського IL-6 в ФСБ протягом ночі при 4 °C. Лунки блокували за допомогою ФСБ, що містить 2 % бичачого сироваточного альбуміну (БСА), промивали, і потім інкубували з 50 мкл супернатанта кожної гібридоми, розведеного 1:2 ФСБ, що містить 2 % БСА. Через 60 хвилин, лунки промивали три рази 300 мкл ФСБ, що містить 0,1 % Tween-20. Потім додавали в кожну лунку антимишачу пероксидазу (anti-mouse-HRP), розведену 1:3000 в ФСБ-БСА та інкубували протягом 30 хвилин. Лунки промивали, як описано вище, а потім додавали субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) та вимірювали сигнал при 450 та 550 нм. Для досліджень антагонізму, репортерні клітини HEK-Blue™-IL6 (InvivoGen, San Diego, CA) інкубували зі зростаючими концентраціями людського IL-6 у присутності розведеного 1:10 супернатанта гібридоми. Через 20-24 годин, 20 мкл супернатанта змішували з 180 мкл QuantiBlue™ (InvivoGen) та вимірювали поглинання при 655 нм.

На основі досліджень зв'язування та антагонізму, гібридома 64 була вибрана заявниками як як найбільш перспективна та субклонована в CRO. Гібридома 64 (мишача моноклональна) була додатково протестована на здатність інгібувати зв'язування комплексу IL-6/IL-6Rα з gp130 методом твердофазового імуоферментного аналізу (ELISA). Гібридома 64 при концентрації 1,5 мкг/мл значно знижувала зв'язування комплексу IL-6/IL-6Rα з іммобілізованим gp130 за результатами аналізу ELISA (Фіг. 2).

Субклони були піддані повторному скринінгу і варіабельні домени субклатону 64.58 були ампліфіковані шляхом 5' RACE ПЛР та секвеновані. Послідовності мишачих варіабельних доменів (позначені як m64) є такими:

VH m64 (варіабельний домен важкого ланцюга)

QVQLQQSGAELVRPGTGVKVSCKASGYAFSNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVITPGSGTINYNEKF
KGKAVLTADKSSSTVYMLSSLTSDDSAVYFCAKSRWDPLYYYALEYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:13)

VL m64 (варіабельний домен легкого ланцюга)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSQVPAR
FSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKVEPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:14)

Для створення гуманізованих послідовностей, гіперваріабельні ділянки m64 (CDR) переносили на каркасну область зародкової лінії людини, вибрану за ступенем подібності до мишачої послідовності за допомогою обчислювального алгоритму. Гуманізовані послідовності (позначені h64) були такими (зміннені залишки у порівнянні з послідовностями m64 підкреслені) та мали приблизно 79,5 % ідентичності (VH) та 84,4 % ідентичності (VL) з мишачими послідовностями:

VH h64

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFS^{NY}LIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTINYAQKF
QGRVTITADESTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDP^{LY}YYALEYWGQGTIVTVSS (SEQ ID
NO:15)

5 VL h64

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGISFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNQGS^{GV}ПД
PFSGSGSGTDFTLT^{IS}SLQAEDVAVYYCQQSKEVPLTFGQGT^{KLE}JK (SEQ ID NO:16)

Гуманізовані послідовності були синтезовані фірмою DNA2.0 (Menlo Park, CA), потім клоновані в експресійні вектори, одержані з pcDNA3.1 як вбудовуване злиття (inline fusions) з константними доменами людського IgG1. IgG експресували транз'єнтною трансфекцією в клітини Freestyle™-293 (Invitrogen, Grand Island, NY) та очищали хроматографією на білку А. В дослідженнях як зв'язування, так і антагонізму, h64 IgG демонстрували значно знижену ефективність у порівнянні зі своїм попередником m64. Тому використовували дріжджовий дисплей для відновлення втраченої афінності.

15 Для проведення дозрівання афінності, призначеного для відновлення або поліпшення афінності гуманізованого h64IgG, послідовності антитіла h64 повторно клонували в дріжджових векторах на основі pYC2/CT для одержання молекули Fab, у якій ланцюг FabH був злитий з анти-FITC scFv 4m5.3 через лінкер (G4S)3 (SEQ ID NO: 29). Потім генерували бібліотеку варіантів h64 шляхом помилково спрямованої ПЛР згідно з протоколом Chao et al. (2006, Nature
20 Protocols, 1:755-768). Варіанти H64 експресували та захоплювали на поверхні дріжджів, мічених FITC-PEG-NHS, потім інкубували з біотинільованим людським IL-6. Зв'язаний IL-6 детектували стрептавідином-APC, і клітини з найбільшою кількістю зв'язаного IL-6 порівняно з кількістю виставлених Fabs вибирають на клітинному сортері BD FACSAria™. Після чотирьох раундів селекції відбирають та секвенують популяцію варіантів з більш високою афінністю.
25 Послідовність клона, вибраного шляхом дозрівання афінності (позначений h64-1.4) наведена далі, причому вибрані мутації (тобто, мутовані у порівнянні з послідовностями VH та VL h64) виділені жирним шрифтом і CDR підкреслені. Представлені варіабельні домени 018 (а також молекул 020 та 029 IL-6а, описані нижче). Зазначимо, що повні Fabs включають домени СК та CH1 IgG1. В контексті даної заявки, посилання на амінокислотну послідовність важкого ланцюга або легкого ланцюга "Fab" означає, що послідовність може бути частиною функціонуючого Fab, що складається з послідовності, одержаної з легкого ланцюга, та послідовності, одержаної з важкого ланцюга.

VH h64-1.4 (018VH) (варіабельний домен)

35 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYALS^{NY}LIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTINYAQKF
QGRVTITADESTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDP^{LY}YYALEYWGQGTIVTVSS (SEQ ID
NO:17)

VL h64-1.4 (018VL) (варіабельний домен)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGI^{PF}FMNWYQQKPGQPPKLLIYAASN^{RG}SGVПДР
FSGSGSGTDFTLT^{IS}SLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGT^{KLE}IKRTV (SEQ ID NO:18)

40 Варіабельні домени h64-1.4 повторно клонували у вектор pcDNA3.1 людського IgG1 та експресували у вигляді повнорозмірного IgG1 в клітинах Freestyle™-HEK293 (Life Technologies). Одержаний очищений IgG був значно активнішим, ніж вихідне антитіло h64 за результатами досліджень як зв'язування, так і клітинного антагонізму. За результатами тестування афінності з використанням системи дріжджів, афінність зростала з 343 пМ для вихідної гуманізованої молекули до 43 пМ. Ефективність антагоніста зросла приблизно у десять разів за результатами визначення з використанням системи клітин HEK-Blue.

45 h64-1.4 IgG переформатували у вигляді Fab для застосування в очах та за іншими показаннями. Додатково, був проведений ще один раунд генерування бібліотеки та селекції на основі дріжджів для додаткового підвищення афінності. Після чотирьох раундів селекції, у варіанті VH спостерігалось значне збагачення мутацією A79V. Антитіла, їх варіанти та фрагменти, що включають варіант A79V, позначені як 019 антитіла IL-6а, їх варіанти та фрагменти.

Приклад 3: Вибір формату

55 Для дослідження придатних форматів для антагоніста IL-6 на основі антитіл, антитіла IL-6, вибрані, як описано вище, тестують на транз'єнтну експресію, стабільність, здатність до агрегації, афінність зв'язування, та IC50, з використанням Fab, scFv(VH-VL) та scFv(VL-VH) форм послідовностей 018.

Результати цих досліджень для одного з кандидатів молекули IL-6а (послідовності, що містять варіабельну ділянку 018), представлені у Таблиці 1.

60

Таблиця 1

Параметр	Fab	scFv(V _H -V _L)	scFv(V _L -V _H)
Транзйентна експресія	45 мг/мл	2 мг/л	4 мг/л
Стабільність (T _M)	73 °C	43 °C	46 °C
Агрегація (SEC, MALS)	Ні	Так	н.д.
Афінність зв'язування (K _D)	240 пМ	1 нМ	720 пМ
IC50 з 10 пМ IL-6	255 пМ	160 пМ	125 пМ

Ці дані демонструють спосіб ідентифікації ключових ознак різних форматів антагоніста IL-6 на основі антитіла та показують, що для антагоністів IL-6, які містять варіабельні ділянки 018, формат 018Fab має найкращі ознаки в більшості ключових категорій, тобто, експресії, стабільності, агрегації та афінності зв'язування у порівнянні з конфігурацією scFv. Величина IC50 для 018 Fab потрапляє до діапазону, прийнятного для терапевтичного застосування.

Приклад 4: Приклади антитіл IL-6а, фрагментів та похідних

Заявники ідентифікували наступні послідовності з використанням способів, описаних в даному документі. Підкреслені послідовності позначають CDR важкого та легкого ланцюгів. Інші послідовності наведені в інших розділах опису винаходу.

Поліпептидна послідовність важкого ланцюга 018 (повнорозмірний; f018HC) в каркасі IgG1

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYALSNIIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTINYAQKF
QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYALEYWGQGTITVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
GTQTYIXHBNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:19)

Послідовність нуклеїнової кислоти важкого ланцюга 018 (повнорозмірний; f018HC) в каркасі IgG1

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGTAT
CTTGTAAGCGCTCTGGTTACGCCCTTTCAAACCTACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCCCGG
CCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTATCACCCCTGGGAGCGGCACCATTAATTACGCCCAGAAA
TTTCAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCACTACTGCCTACATGGAGCTGTCTCT
CACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCCGGAGTTCGATGGGACCCCTCTTTACTA
TTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCTATCTGCTAGCACAAAAGGA
CCATCAGTCTTCCCACCTTGCTCCTTCATCTAAGAGCACAAAGTGGTGGCACTGCAGCCCTTGGCTG
CCTGGTGAAAGATTATTTCCCCGAACCTGTTACAGTTTCTTGGAACCTCCGGTGCAGTGCATCCG
GAGTACACACTTTCCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTATAGCCTGTCTTCGGTGGTCAAC
TGTTCCATCGTCGAGTCTTGGCACACAGACATATATTTGCAACGTCAATCACAAGCCCTCCAACA
CAAAAGTGGATAAGAAGGTCGAGCCCCAAATCTTGTGACAAGACCCATACGTGTCTCTCCCTGTCC
CGCCCCTGAACTGCTGGGAGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCACCTAAGCCAAAGGACACTCTG
ATGATCAGCCGGACTCCCGAGGTTACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCATGAAGACCCTGAGG
TTAAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTGCAGGTGCATAACGCAAAAACCAAGCCGAGAGAGGA
GCAGTACaATAGCACCTATAGAGTAGTAGTGAGCGTCTGCTGACTGTCTTACATCAGGATTGGCTCAATGG
TAAAGAATATAAGTGCAAGGTAAGCAACAAGGCCCTACCCGCACCAATAGAGAAGACCATCTCCA
AGGCGAAAGGTCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTTTATACACTGCCTCCCTCACGCGACGAATTAAC
AAAGAATCAGGTGTCTCTCACCTGTCTCGTCAAGGGCTTTTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAATCCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTATAAGACAACCTCCCCAGTCTGGATTGAGATGG
GTCGTTCTTTCTATATAGTAAGTTGACCGTGGATAAGTCTCGCTGGCAACAGGGGAACGTGTTCT
CTTGCTCTGTTATGCATGAAGCGCTGCACAATCATTATACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCC
GGGAAG (SEQ ID NO:20)

Поліпептидна послідовність важкого ланцюга 018 Fab (018FabHC) в каркасі IgG1. CDR підкреслені

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYALSNIIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTINYAQKF
QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYALEYWGQGTITVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
GTQTYIXHBNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEQ ID NO:1)

Поліпептидна послідовність повнорозмірного легкого ланцюга 018 (f018LC). CDR підкреслені

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCREASESD NYGIPFMNWX QQKPGQPPKL LIYAASNRGS
GVNDFPFGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPL TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF

IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:2)

Ця послідовність належить також легким ланцюгам антагоністів IL-6 020 та 029.

Послідовність нуклеїнової кислоти повнорозмірного легкого ланцюга 018 (018LC) в каркасі

5 IgG1

GACATAGTGA TGA CTCAAAG TCCGGACAGC CTGGCGGTGT CACTCGGCGA
ACGGGCAACT ATCAACTGCC GAGCCAGCGA GAGCGTCGAT AATTACGGCA TCCCCTTCAT
GAACTGGTAT CAGCAGAAGC CAGGACAGCC GCCCAAGCTG CTTATCTACG CCGCTTCCAA
10 CCGGGGATCA GGGGTGCCCG ATCGATTAG TGGAAGCGGT AGTGGGACCG ATTTACACT
GACCATCAGC TCCCTTCAGG CCGAGGATGT GGCTGTCTAT TATTGTCAGC AATCCGAGGA
AGTGCCGCTC ACGTTTGGTC AGGGAACCAA ACTGGAGATC AAGCGGACCG TAGCGGCGCC
TAGTGTCTTC ATCTTCCCAC CCTCCGACGA ACAGCTGAAG TCTGGCACTG CTTCCGTCGT
GTGCTGCTC AACAACTTTT ACCCTAGAGA GGCAAAAGTT CAATGGAAAG TAGACAATGC
CTTGCTAGTCC GGGAACTCCC AGGAGTCTGT CACAGAGCAG GATAGTAAGG ACTCAACCTA
15 CAGCCTGTCC AGCACACTGA CCCTCTCCAA AGCCGACTAC GAGAAGCACA AAGTGACGC
TTGCGAAGTT ACGCATCAGG GGCTGTCCTC ACCCGTTACA AAAAGTTTTA ACAGAGGGGA
GTGC (SEQ ID NO:26)

Важкий ланцюг 019 Fab (019FabHC, така сама послідовність, як і 018FabHC, за винятком A79V (жирний шрифт/курсив)

20 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY
AQKFQGRVTI TADESTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWQGTTVT
SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSV VTPSSSLGT QTYIXHBNHK PSNTKVDKKV EPKSC (SEQ ID NO:3)

019 VH (варіабельна ділянка/019HC)

25 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY
AQKFQGRVTI TADESTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWQGTTVT SS
(SEQ ID NO:27)

Послідовність (поліпептида та нуклеїнової кислоти) легкого ланцюга антитіла 019 (019LC) є такою саме, як 018LC

30 CDR1 018HC (VH CDR1 018): GYALSNYLIE (SEQ ID NO:4)
CDR2 018HC (VH CDR2 018): VITPGSGTIN (SEQ ID NO:5)
CDR3 018HC (VH CDR3 018): SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO:6)
CDR1 018LC (VL CDR1): RASESVDNYGIPFMN (SEQ ID NO:7)
CDR2 018LC (VL CDR2): AASNRGS (SEQ ID NO:8)
35 CDR3 018LC (VL CDR3): QQSEEVPLT (SEQ ID NO:9)
CDR1 019HC (VH CDR1 019): GYALSNYLIE (SEQ ID NO:4)
CDR2 019HC (VH CDR2 019): VITPGSGTIN (SEQ ID NO:5)
CDR3 019HC (VH CDR3 019): SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO:6)

Приклад 5: Картування епітопу та структури

40 Картування епітопу

Картування функціонального епітопу проводили для вибраного кандидата антагоністів IL-6. Було знайдено, що антитіло-кандидат (мишаче антитіло 64) не знижує зв'язування IL-6Rα з IL-6 за результатами ELISA, що означає, що антитіло-кандидат не зв'язується із сайтом I. Були проведені додаткові експерименти, які продемонстрували, що химерне мишаче антитіло 64
45 знижує зв'язування комплексу IL-6/IL-6Rα з gp130 за даними ELISA, що свідчить про те, що сайт II або сайт III IL-6 містить зв'язуючий сайт антитіла. Було також знайдено, що мишаче антитіло 64 не блокує в значному ступені зв'язування відомого сайту III зв'язування антитіла AH-65 (Immunotech, Marseille, France) з IL-6, що вказує на те, що антитіло-кандидат зв'язується із сайтом II IL-6. Ці дані демонструють, що можуть бути одержані антитіла проти сайту II, та
50 демонструють спосіб ідентифікації таких антитіл.

Для додаткового визначення епітопу, були згенеровані мутації IL-6 в дріжджах як злиття з 4m5.3 (Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97, 10701–10705; Chao et al., 2006, Nat Protoc 1, 755–768). Експресовані мутації знаходилися в людському IL-6 з такими одиничними або
55 подвійними мутаціями: R24E/D27E, R30E, Y31E, D34R, S118R/V121E, W157E, Q159E/T162P, K171E та R179E. Експресовані мутантні молекули IL-6 використовували для досліджень зв'язування з 018 (Fab). Знижена афінність по відношенню до 018 (Fab) спостерігалась для R24E/K27E, Y31E, D34R та S118R/V121R, які усі розташовані в сайті II IL-6. Відповідно, винахід, описаний в даному документі, включає антитіло, яке зв'язується із щонайменше однією, двома, трьома, чотирма, п'ятьма або шістьма амінокислотами в положеннях 24, 27, 31, 34, 118, та 121
60 людського IL-6 або еквівалентного сайту IL-6.

Структурне визначення епітопу сайту II

Для структурного визначення сайту II були обчислені наступні розміри. Розрахунки проводили на основі гексамерної кристалічної структури IL-6/IL-6 α /gp130, PDB 1P9M (Boulanger et al., 2003, Science 300: 2101-2104). Спіраль 1 IL-6 знаходиться між сайтом I та сайтом II, приводячи до того, що певні залишки розташовані близько до сайту II, але мають бічні ланцюги, спрямовані до сайту I, наприклад, R30. D2 та D3 стосуються позаклітинних доменів IL-6R α .

Було визначено, що наступні амінокислоти IL-6 розташовані на відстані не більше 5 Å від gp130-D2-D3: L19, R24, K27, Q28, R30, Y31, D34, E110, Q111, R113, A114, M117, S118, V121, Q124, F125 та K128

Було визначено, що наступні амінокислоти розташовані на відстані не більше 7 Å від gp130-D2-D3: L19, E23, R24, I25, K27, Q28, I29, R30, Y31, D34, K41, Q102, E109, E110, Q111, A112, R113, A114, V115, Q116, M117, S118, K120, V121, L122, Q124, F125 та K128.

Відповідно, молекула, наприклад, антитіло або його фрагмент, яка може зв'язуватися з однією чи декількома з амінокислот IL-6, розташованих на відстані не більше 5 Å або 7 Å від сайту II, може бути IL-6a.

Послідовність людського IL-6 наведена нижче для інформації (підкреслена послідовність є лідерною послідовністю). Амінокислоти на відстані до 7 Å від gp130-D2-D3 виділені курсивом. Нумерація амінокислот, наприклад, мутацій, використовується для визначення епітопів, не враховує лідерну послідовність:

Людський IL-6

MNSFSTSAFGPVAFSLGILLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSER/DKQIRYILDGISAL
RKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCFSQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFS
SEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHILRSFKEFLQ
SSLRALRQM (SEQ ID NO:21)

Були проведені експерименти з тестування фрагмента Fab гуманізованого антитіла h64-1.4, які продемонстрували, що він був здатним блокувати як цис-, так і транс-сигналінг IL-6, спричинюваний націлюванням на сайт II. Ефективність фрагмента Fab залишалася незмінною в присутності розчинного рецептора IL-6 (sIL-6R). Це відрізняється від IgG проти IL-6R, який має знижену ефективність у присутності sIL6R, і який блокує тільки цис-сигналінг.

Ці експерименти демонструють, що антитіло або фрагмент антитіла, такий як фрагмент Fab, націлений на сайт II, можуть бути використані для інгібування як цис-, так і транс-сигналіну IL-6.

Приклад 6: Дослідження на приматах

Оскільки активності у тварин, які не є приматами, можуть сильно відрізнятися від показників у приматів, антагоністи-кандидати IL-6 типово додатково оцінюють на фармакокінетичні (PK) та інші параметри з використанням приматів, які не є людиною. Людський IL-6 відрізняється від IL-6 яванського макака та макака-резуса в семи місцях, одне з яких розташоване в сайті II (амінокислота 28) і співпадає з сайтом II IL-6 африканської зеленої мавпи. Воно, очевидно, знижує зв'язування антитіла, що містить послідовності 018, лише в приблизно 3-4 рази. Здатність зв'язуватися з IL-6 примата, що не є людиною, є корисною ознакою антагоніста IL-6, сприяючи розробці з кандидата лікарського засобу, наприклад, забезпечуючи можливість тестування, такого як токсикологічного тестування, на приматах, що не є людиною.

Які більшість антитіл IL-6, антитіла проти IL-6, описані в даному документі, не є перехресно реактивними з IL-6 гризунів, кроля або собачих через низьку гомологію послідовностей. Однак, в дослідженнях афінності було знайдено, що 018 Fab зв'язує IL-6 яванського макака та африканської зеленої мавпи з афінністю, близькою до людської (Таблиця 2).

Таблиця 2

Моновалентна афінність (018 Fab) до різних IL-6 різних видів

Вид	K _D
Людина	200 пМ
Африканська зелена мавпа	280 пМ
Яванський макак	840 пМ
Собака	> 1 мкМ
Миша	> 1 мкМ
Кроль	> 1 мкМ
Щур	> 1 мкМ

Ці дані додатково демонструють здатність IL-6a, описаного в даному документі, специфічно

зв'язуватися, та можливість розробки молекули, що має ознаки, які дозволяють проводити тестування, наприклад, для досліджень токсикології та репродуктивної системи, на придатній тварині.

Приклад 7: Підвищення експресії IL-6a

Для підвищення експресії поліпептидів 018 Fab та 019 Fab, були зроблені конструкти з додаванням п'яти додаткових амінокислот (DKTHT (SEQ ID NO: 30)) у важкий ланцюг в CH1/шарнірній області з використанням способів, відомих фахівцям. Послідовність важкого ланцюга зміненого 018Fab наведена нижче як SEQ ID NO:24. Змінена послідовність 018 називається в даному документі 020, і змінена послідовність 019 називається в даному документі 021. Молекула 020 (важкий ланцюг 020Fab та легкий ланцюг 018Fab) має покращену експресію у порівнянні з батьківським Fab, який має важкий 018Fab та легкий 018Fab ланцюги. Молекула 019 не виявляє значної різниці в афінності у порівнянні з молекулою 020. Експресія як 020, так і 019 зростає приблизно удвічі, відповідно, і зміна не впливала на афінності.

Важкий ланцюг 020 (Fab з DKTHT (SEQ ID NO: 30) на карбоксильному кінці))

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY
AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV
SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSV VTPSSSLGT QTYIXHBNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:24)

Антагонізм до IL-6 з використанням 020Fab вимірювали в репортерних клітинах HEK-Blue™ IL-6 (InvivoGen, San Diego, CA). Клітини інкубували в суміші 10 пМ IL-6 та різних концентрацій 020 або антитіла IL-6Rα (Cell Sciences, Canton, MA), з 50 нМ IL-6Rα або без нього. Через 20-24 годин інкубації, 20 мкл супернатанта клітинної культури змішували з 180 мкл субстрату QuantiBlue™ (InvivoGen) та інкубували протягом однієї години; потім вимірювали поглинання при 655 нм. Фіг. 3A та Фіг. 3B показують результати цих експериментів, які демонструють здатність 020 інгібувати активність IL-6 в присутності IL-6R або без нього.

Приклад 8: Антитіла IgG2 IL-6

018 був переформатований в ізотиповий каркас людського IgG2 для зниження зв'язування FcγR та зниження ADCC у порівнянні з антитілом, сформатованим в IgG1, з використанням способів, відомих фахівцям. Крім того, очікується, що переформатування 018 в повнорозмірний формат, наприклад, IgG2, буде знижувати швидкість кліренсу зі склистого тіла внаслідок великого розміру молекули.

Конструювання/очистка антитіла IgG2 проти IL6

Для конструювання людського антитіла IgG2 з використанням послідовностей проти IL-6, описаних вище, константний домен людського IgG2 був ампліфікований методом ПЛР з кДНК із сайтами рестрикції NheI та MluI на N- та карбоксильному кінцях, відповідно. Продукт ПЛР очищали, гідролізували рестрикційними ферментами NheI та MluI, і потім лігували в вектор pTT5, що містить варіабельний домен проти IL6, тобто, SEQ ID NO:1 (див. вище). Це давало послідовність важкого ланцюга повнорозмірного IgG2. Плазмід, що містять повнорозмірний легкий ланцюг, який містить послідовність 018, використовували для одержання легкого ланцюга.

Для додаткового зниження зв'язування з FcRn і, тим самим, зниження рециклінгу IL-6a, у важкому ланцюзі були зроблені точкові мутації. Мутації робили методом мутагенезу QuikChange® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Плазмід важкого та легкого ланцюгів ко-трансфекували з використанням полі(етиленіміну) (PEI) в 100 мл транзйєнтних культур клітин HEK293-6E та культивували для забезпечення експресії протягом приблизно п'яти днів. Такі згенеровані антитіла містили зв'язуючий фрагмент проти сайту II IL-6 та мали структуру IgG2. Такі структури, що містять CDR 018, називаються в даному документі 018IgG2 або 029. Точкові мутації робили у залишках I253

Молекула IgG2 гарно експресувалася та блокує IL-6 за результатами клітинних аналізів з трохи покращеною ефективністю у порівнянні з 020Fab.

Зрілі послідовності 029 (CDR підкреслені)

Важкий ланцюг 029

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY
AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV
SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSV VTPSSNFGT QTYTXHBDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPE CPAPPVAGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH E DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIETISKY KGQPREPQVY TLPPSREEMT
KNQVSLTCLV KGFYPSDIIV EWESNGQPEV NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:11)

Легкий ланцюг 029

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMNWY QQKPGQPPKL LIYAASNRGS
 GVПДФSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPL IFGQGTKLEI KRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 5 STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:12)

Змінене зв'язування з FcRn

IL-6 може мати певні позитивні системні ефекти. Тому краще сконструювати IL-6а, який би
 гарно утримувався у склистому тілі, але мав обмежений системний період напіввиведення.
 Зниження або усунення зв'язування з FcRn повинно зменшити системне накопичення, якщо
 10 якщо кількість лікарського засобу потрапить до кровообігу, тим самим покращуючи безпеку IL-
 6а.

Відповідно, оскільки медійований FcRn транспорт може збільшувати витік антитіл з ока, IgG2
 020 був додатково модифікований з метою усунення зв'язування з FcRn шляхом введення
 мутацій Fc у залишки I254, H311 або H436 (див. SEQ ID NO:23), нумерація згідно з Martin et al.,
 15 Molecular Cell, 7:4, 867-877 (2001)). Мutowані сайти виділені жирним шрифтом в SEQ ID NO:23;
 I254 був мutowаний на A або R, H311 був мutowаний на A або E, H311 був мutowаний на N з
 D313, мutowаним на T, і H436 був мutowаний на A (нумерація починається після лідерної
 послідовності, яка підкреслена в SEQ ID NO:23. Антагоністи IL-6, що містять такі послідовності,
 були названі 018lgG2m.

Важкий ланцюг (антитіла) проти IL-6 (IgG2) (нормальний шрифт: VH; курсив: CH) (без
 лідерної послідовності) з виділеними сайтами мутацій (жирний шрифт)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY
 AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV
 SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
 25 SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTXHBDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS
 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
 FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT
 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:23)

Важкий ланцюг (антитіла) проти IL-6 (IgG2) (нормальний шрифт: VH; курсив: CH) з лідерною
 послідовністю (підкреслена) з виділеними сайтами мутацій (жирний шрифт)

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA
 PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR
 WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT
 35 VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTXHBDHK PSNTKVDKTV
 ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK
 TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:28)

Відповідно, деякі варіанти реалізації включають антитіло, що має послідовність важкого
 ланцюга, представлену в SEQ ID NO:23 з мутаціями в I254 (наприклад, A або R), H311
 (мutowаний на A або E), H436 (мutowаний на A), або D313 (мutowаний на T) з H311, мutowаним
 на N.

Таким чином, SEQ ID NO:25 показує послідовність, яка, з мутаціями в положеннях I133
 45 (наприклад, I133A або I133R), H190 (наприклад, H190A або H190E), H315 (наприклад, H315A),
 або D192 з H190 (наприклад, D192T з H190N) може бути використана в антитілі, його фрагменті
 або похідному, для одержання поліпептиду, що має знижене зв'язування Fc при низьких pH,
 наприклад, pH 5,5, або лізосомальному pH, та/або поліпептиду, що має знижений системний
 період напіввиведення у порівнянні з батьківською або іншою референсною молекулою, яка не
 50 містить послідовності.

SASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTXHBDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS
 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
 FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT
 55 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:25)

Легкий ланцюг (антитіла) проти IL-6 (IgG2) (нормальний шрифт: VK; курсив: CK)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWWYQQKPGQPPKLLIYAASNRGSGVПДФS
 GSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
 60 SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLISKADY

EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:22)

Приклад 9: Стабільність композиції

Стабільність фрагмента Fab проти IL-6/IgG1 (що містить домен IgG1CH1) тестували шляхом визначення T_m спочатку в ФСБ, а потім в ряді буферів та ексципієнтів з використанням диференціальної скануючої флуориметрії. Було знайдено, що цитратний буфер, pH 5,5, підвищував T_m до більш ніж 80 °C. Відповідно, в деяких варіантах реалізації, IL-6а передбачається в цитратному буфері, і в деяких випадках має T_m щонайменше 80 °C.

Агрегацію тестували методом ексклюзійної хроматографії з багатокутовим розсіюванням лазерного світла (SEC-MALS), і агрегацію не спостерігали при 20 мг/мл в фосфатно-сольовому буфері (ФСБ).

Приклад 10: pH-чутливі антитіла для поліпшення фармакодинаміки (PK)

IL-6 може мати певні позитивні системні ефекти. Тому краще сконструювати IL-6а, який би мав гарне утримання у склистому тілі, але обмежений системний період напіввиведення. Зниження або усунення зв'язування з FcRn повинно зменшити системне накопичення, якщо певна кількість лікарського засобу потрапить до кровообігу, тим самим покращуючи безпеку IL-6а. Відповідно, оскільки медіований FcRn транспорт може збільшувати витік антитіл з ока, IgG2 020 був додатково модифікований для усунення зв'язування з FcRn шляхом введення мутацій Fc у залишки I253, H310 або H435 (нумерація згідно з Martin et al. (Molecular Cell, 7:4,867-877 (2001))). Такі антитіла називаються в даному документі антитілами IL-6pH або антитілами проти IL-6pH і додатково описані нижче.

Одержання антитіл з pH-чутливим зв'язуванням

Величина pKa гістидину становить приблизно 6,0 і гістидини, введені в поверхні зв'язування, можуть перешкоджати зв'язуванню при протонуванні бічних ланцюгів при низькому pH. З використанням антитіла проти сайту II IL-6, описаного в даному документі, була згенерована бібліотека, що містить варіанти CDR 018 з високим вмістом гістидину, і бібліотека була піддана скринінгу на pH-чутливе зв'язування з використанням дріжджового дисплея. Згенерована бібліотека була комбінаторною бібліотекою з CDR, кодованими виродженими кодонами, так щоб кожен залишок був або залишком дикого типу (тобто, таким самим, як у батьківському антитілі), або гістидиновим залишком. Скринінг проводили шляхом сортування по черзі з високим зв'язуванням при фізіологічному pH (7,4), та з низьким зв'язуванням при ендосомальному pH (5,5).

Селектований на дріжджах мутант був ідентифікований як такий, що має відносно високе зв'язування при pH 7,4 (моновалентна Kd 407 пМ для мутанта у порівнянні з 192 пМ для батьківської молекули) та відносно низьке зв'язування при pH 5,5 (моновалентна Kd 2,362 нМ для мутанта у порівнянні з 195 пМ для батьківської (молекули)). Це відповідає приблизно 5,8-кратній зміні афінності при pH 5,5. Цей мутант містив численні гістидинові мутації в легкому ланцюзі CDR1. Таким чином, мутант демонстрував зв'язування, близьке до батьківської молекули при pH 7,4, і значну втрату афінності при pH 5,5. Це спостереження було підтверджене шляхом аналізу методами ELISA, FACS та ППР, відомими фахівцям.

Ці дані демонструють можливість створення на основі антитіла IL-6а з ознаками активності проти IL-6, націленої на сайт II IL-6, який може бути використаний для інгібування як цис-, так і транс-активності IL-6, та має покращену фармакокінетику (PK) у порівнянні з батьківським антитілом або іншим антитілом, що має Fc-домен дикого типу, спричинену щонайменше частково зміненим зв'язуванням при pH 5,5.

Приклад 11: Ефективність місцевої блокади IL-6 у мишачій моделі лазерної хоріоїдальної неоваскуляризації (ХНВ)

Для визначення того, чи може місцева блокада IL-6 бути ефективною при лікуванні хвороби ока, наприклад, діабетичного макулярного набряку (ДМН) або вологої ВМД, моноклональне антитіло проти IL-6 місцево вводили в модельній системі хоріоїдальної неоваскуляризації. В цьому Прикладі використовували модель лазер-індукованої ХНВ, описану у Saishin et al., Journal of Cell Physiology, 195:241–248 (2003). Модель лазер-індукованої ХНВ відтворює багато патологічних процесів, що лежать в основі діабетичного макулярного набряку (ДМН), включаючи запалення та ангиогенез.

Моноклональне антимишаче антитіло IL-6 (MP5-20F3, яке є щурячим антитілом ізотипу IgG1, придбаним у фірми Bio X Cell, № за каталогом BE0046) вводили тестованій групі шляхом інтравітреальної (IVT) ін'єкції. Контролі отримували інтравітреальну ін'єкцію пастки VEGF або інтравітреальну ін'єкцію ізотипового контрольного антитіла проти пероксидази хрому (HRP) (щурячий IgG1 проти пероксидази хрому, клон HRPN, придбаний у фірми BioXCell; № за каталогом BE0088). Для усіх груп антитіла, 20 мкг білка в об'ємі 1 мкл вводили ін'єкцією в тестове око, в той час як протилежне око залишали без обробки як додатковий контроль.

Мишей піддавали евтаназії в день 7 після лазерної обробки і хоріоїдальні плоскі гістологічні препарати фарбували лектином Griffonia simplicifolia (GSA) для вимірювання площі ураження. Фіг. 4 зображує результати. Група, яка отримувала антитіло проти IL-6, продемонструвала статистично значуще зниження неоваскуляризації у порівнянні з групою, що отримувала контрольне антитіло ($p < 0.05$). В середньому, група, що отримувала антитіло проти IL-6, також продемонструвала знижену неоваскуляризацію порівняно з позитивним контролем проти VEGF.

Ці дані демонструють, що IL-6а, наприклад, моноклональне антитіло проти IL-6, введене інтравітреально (IVT), може значно знижувати неоваскуляризацію у мишачій моделі ХНВ. Результати додатково дозволяють припустити, що антитіло проти IL-6 може спричинювати зниження неоваскуляризації, яке є щонайменше таким саме великим, і можливо більшим, ніж для антитіла проти VEGF. Ці дані показують, що місцеве інгібування IL-6 є придатним для лікування хвороби ока, такої як хвороби, пов'язаної із судинним просочуванням, наприклад, вологої ВМД або макулярного набряку, наприклад, діабетичного макулярного набряку.

Приклад 12: Розробка удосконаленого антитіла IL-6

Були згенеровані варіанти антитіла EBI-029. Для того, щоб краще охарактеризувати внесок мутації A28V, S30P, I51T та S55G, конкретні комбінації вводили в вектор Fab-дисплея EBI-029 дикого типу та вимірювали зв'язування. Результати представлені на Фіг. 5. Після конкуренції з 2 мкМ IL-6 протягом ночі, усі мутанти мали значно вищі рівні біотинільованого IL-6, що залишився на їх клітинній поверхні по відношенню до дисплея у порівнянні з Fab EBI-029 дикого типу. Ранговий порядок зв'язування від найвищої до найнижчої афінності був таким A28V/S30P/I51T/S55G > A28V/I51T/S55G > S30P/I51T/S55G > I51T/S55G > дикий тип (wt). Четверна мутація A28V/S30P/I51T/S55G також називається в даному документі EBI-030.

Послідовності EBI-030 наведені нижче.

Послідовності CDR 030:

CDR1 030HC (VH CDR1 030): GYVLPNYLIE (SEQ ID NO:31)
 CDR2 030HC (VH CDR2 030): VITPGGGTIN (SEQ ID NO:32)
 CDR3 030HC (VH CDR3 030): SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO:33)
 CDR1 030LC (VL CDR1 030): RASESVDNYGIPFMN (SEQ ID NO:34)
 CDR2 030LC (VL CDR2 030): AASNRGS (SEQ ID NO:35)
 CDR3 030LC (VL CDR3 030): QQSEEVPLT (SEQ ID NO:36)

Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга 030 (мутації порівняно з 029 виділені жирним шрифтом):

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP **NYLIEWVRQA** PGQGLEWMGV **TTPGGGTINY**
 AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR **WDPLYYYALE** YWGQGTITVTV SS
 (SEQ ID NO:37)

Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга 030:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMN **WYQQKPGQPPKLLIYAASNRGSGV** ПДР
 FSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC**QQSEEVPLT**FGQGGTKLEIKRTV (SEQ ID NO:38)

Поліпептидна послідовність важкого ланцюга Fab (IgG1) 030 (CDR підкреслені, мутації порівняно з 029 виділені жирним шрифтом):

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP **NYLIEWVRQA** PGQGLEWMGV **TTPGGGTINY**
 AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR **WDPLYYYALE** YWGQGTITVTV
 SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYIXHBNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:39)

У варіантах реалізації, послідовність DKTHT (SEQ ID NO:30) на карбоксильному кінці SEQ ID NO:39 не включена до послідовності Fab.

Послідовність нуклеїнової кислоти важкого ланцюга Fab 030:

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGTAT
 CTTGTAAGCGTCTGGTTACGTCTTCCAACTACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCCCGG
 CCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACACCCCTGGGGGCGGCACCATTAATTACGCCAGAA
 ATTTACAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCACTACTGCCTACATGGAGCTGTCC
 TCACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGGAGTCGATGGGACCCCTCTTACT
 ATTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCTATCTGCTAGCACAAAAGG
 ACCATCAGTCTTCCCACTTGCTCCTTCATCTAAGAGCACAAAGTGGTGGCACTGCAGCCCTTGGCT
 GCCTGGTGAAAGATTATTTCCCGAACCTGTTACAGTTTCTTGGAACCTCCGGTGCAGTGCATCC
 GGAGTACACACTTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTATAGCCTGTCTTCGGTGGTCA
 CTGTTCCATCGTCTGAGTCTTGGCACACAGACATATTTGCAACGTCAATCACAAGCCCTCCAAC
 ACAAAAGTGGATAAGAAGGTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACACA (SEQ ID NO:40)

030 може бути також одержаний як поліпептидна послідовність важкого ланцюга Fab IgG2:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCCKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTTTPGGGTINYAQK

FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDP LYYYALEYWGQGTTVTVSSASTKGPSV
 FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN
 FGTQTYTXHBDHKPSNTKVDKTVRK

(SEQ ID NO:54)

5 Приклад 13: Експресія та очистка фрагментів варіанта Fab

Вставки в домен VH, що містять наступні комбінації мутантів - A28V/I51T/S55G, S30P/I51T/S55G та A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030), були згенеровані з векторів дріжджового дисплея подвійним гідролізом BamHI-HF/NheI-HF. Вставки очищали шляхом електрофорезу на 1 % агарозному гелі та лігували в експресійний вектор ссавців, одержаний з рТТ5, який містив лідерну послідовність, домен CH1 людського IgG1, та С-кінцеву His-мітку. Трансформанти піддавали селекції на LB-Amp (середовище Ленгмюра-Блоджетт з ампіциліном), виділяли ДНК за допомогою набору Miniprep, та вставки підтверджували шляхом секвенування. Транз'єнтну трансфекцію проводили в клітинах HEK-6E (Canadian Research Council) для кожного важкого ланцюга мутантного Fab, спареного з легким ланцюгом EBI-029 дикого типу (розкритий в даному документі як SEQ ID NO:12) з використанням PEI як реагента трансфекції. Fab EBI-029 дикого типу також експресували як контроль (важкий ланцюг Fab дикого типу розкритий в даному документі як SEQ ID NO:24). Супернатанти збирали через 5 днів та експресовані Fab очищали афінною хроматографією з використанням агарози Ni-NTA (Life Technologies). Для очищеного білка буфер заміняли на ФСБ, pH 7,4, за допомогою декількох раундів концентрування/розведення і концентрацію білка та чистоту визначали за поглинанням на довжині хвилі 280 нм та методом електрофорезу на поліакриламідному гелі в присутності ДСН (ДСН-ПААГ).

Приклад 14: Варіант антитіла продемонстрував покращене зв'язування за результатами аналізу методом поверхневого плазмонного резонансу

25 Афінності молекул Fab варіанта 029 по відношенню до IL-6 вимірювали методом поверхневого плазмонного резонансу (ППР) на спектрометре Reichert SR7000Dc. Імобілізували людський IL-6 в кількості 20 мкг/мл в 10 мМ ацетату натрію, pH 4,5, на чипі 500 кДа карбоксиметилдекстрану шляхом стандартного амінного сполучення. Серійні розведення кожної молекули Fab в 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,3, вприскували при 25 °C зі швидкістю 30 25 мкл/хв. Через 4 хвилини навантаження припиняли і дисоціацію вимірювали шляхом пропускання потоку рухомого буфера (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,3) протягом 5 хвилин. Криві сенсограм погано погоджуються з моделлю зв'язування 1:1, потенційно через змішану орієнтацію IL-6 на чипі або неспецифічне зв'язування антитіла. Замість цього, криві апроксимували моделлю з 2 видами молекул (з низькою афінністю та високою афінністю, 35 помічені "низька афінність" та "висока афінність" у Таблиці 3) з використанням прикладної програми TraceDrawer, де ka1, kd1 та KD1 позначають швидкість асоціації, швидкість дисоціації, та рівноважну константу зв'язування для молекул з низькою афінністю, і ka2, kd2 та KD2 позначають швидкість асоціації, швидкість дисоціації та рівноважну константу зв'язування для молекул з високою афінністю. Усі мутантні Fab мали значно повільнішу дисоціацію у порівнянні 40 з Fab EBI-029 дикого типу (wt) в такому порядку від найвищої до найнижчої афінності - A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030) > S30P/I51T/S55G > A28V/I51T/S55G > дикий тип (WT) (EBI-029).

Таблиця 3

Результати ППР для мутантних антитіл

Fab	ka1 (*e ⁴)	kd1 (*e ⁻⁴)	KD1 (нМ)	ka2 (*e ⁴)	kd2 (*e ⁻⁴)	KD2 (нМ)
Дикий тип (WT)	5,48	6,08	11,1	2,94	4,27	1,45
A28V/I51T/S55G	8,06	2,91	3,6	3,65	1,45	0,40
S30P/I51T/S55G	7,18	2,18	3,04	3,29	0,95	0,29
A28V/S30P/I51T/S55G	7,95	2,70	3,39	3,25	0,66	0,20
низька афінність			висока афінність			

45 Приклад 15: Варіанти антитіл продемонстрували покращену антагоністичну ефективність в репортерних клітинах HEK-Blue™ IL6

Лінія репортерних клітин HEK-Blue™ IL6 (Invivogen) була використана для порівняння ефективності інгібування сигналіну IL6 між різними мутантними фрагменти Fab EBI-029. Клітини HEK-Blue™ IL6 є модифікованою лінією HEK293, яка стабільно експресує ген IL-6R та

містить секретований репортерний ген лужної фосфатази під контролем мінімального промотора IFN β , злитого з чотирма зв'язуючими сайтами STAT3. Для вимірювання антагонізму IL6, 10 мкл 400 пМ людського IL-6 (R&D Systems 206-IL-010/CF) змішували з 10 мкл кожного варіанта Fab в діапазоні концентрацій на 96-лунковому планшеті та інкубували при кімнатній температурі (RT) протягом 30 хвилин. Клітини HEK-Blue™ IL6 на логарифмічній фазі росту трипсинізували та ресуспендували в середовищі для аналізу (ДМНМ, 4,5 г/л глюкози, 10 % термоінактивованої сироватки плоду корови (СПК), 2 мМ L-глутаміну, пеніцилін-стрептоміцин (Pen-Step)) при 280000 клітин/мл. Додавали 180 мкл суспензії клітин в кожну лунку із сумішами IL-6/Fab для доведення кінцевої концентрації IL-6 до 20 пМ. Клітини інкубували при 37 °C/5 % CO₂ протягом 20 годин. Потім змішували 20 мкл супернатанта з кожної лунки з 180 мкл реагенту Quanti-Blue™ (Invivogen) та інкубували при 37 °C протягом 40 хвилин перед вимірюванням поглинання при 650 нМ на планшет-ридері SpectraMax M5. Віднімали фоновий сигнал для лунок без IL-6 і потім ділили на (величину поглинання) для клітин, оброблених IL-6 без інгібітора для одержання відносного значення сигналіну. Усі мутанти продемонстрували значно вищу ефективність у порівнянні з Fab EBI-029 дикого типу (wt), з наступним порядком величини антагоністичної ефективності: A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030) > A28V/I51T/S55G > S30P/I51T/S55G > дикий тип (WT) (EBI-029). Ці результати представлені на Фіг. 6.

Приклад 16: Варіанти антитіл продемонстрували покращену антагоністичну ефективність за результатами аналізу проліферації T1165

Клітини T1165.85.2.1 (R&D Systems) є клітинною лінією мишачої плазмацитоми, яка проліферує у відповідь на мишачий, щуриний або людський IL-6. Для вимірювання антагонізму до мутантного Fab EBI-029, 25 мкл 2 нг/мл людського IL-6 (R&D Systems 206-IL-010/CF) змішували з 25 мкл кожного варіанта Fab в діапазоні концентрацій на 96-лунковому планшеті та інкубували при кімнатній температурі (RT) протягом 30 хвилин. Клітини T1165 на логарифмічній фазі росту збирали центрифугуванням та ресуспендували в середовищі для аналізу (90 % RPMI 1640, 10 % СПК, 2 мМ L-глутаміну, пеніцилін-стрептоміцин (Pen-Strep)) при 2×10⁵ клітин/мл. Додавали 50 мкл суспензії клітин в кожну лунку сумішей IL-6/Fab для доведення кінцевої концентрації IL-6 до 0,5 нг/мл. Клітини інкубували при 37 °C/5 % CO₂ протягом 72 годин. Додавали в кожну лунку 100 мкл реагенту Cell-Titer Glo® (Promega) та інкубували при кімнатній температурі (RT) протягом 10 хвилин. Вимірювали люмінесценцію на планшет-ридері SpectraMax M5. Усі мутанти демонстрували значно більшу ефективність у порівнянні з Fab EBI-029 дикого типу (wt) без вимірного сигналіну IL-6 в протестованому діапазоні концентрацій Fab (див. Фіг. 7).

Приклад 17: Порівняння подібних до лікарських засобів властивостей варіантів антитіл

Теплостійкість кожного варіанта Fab визначали методом диференційної скануючої флуориметрії (DSF). Змішували 2 мкл білка з концентрацією 2,5 або 5 мг/мл з 18 мкл ФСБ та 2 мкл 50× Sypro Orange на 96-лунковому планшеті BioRad для ПЛР. Планшет аналізували за допомогою системи ПЛР зі зворотною транскриптазою BioRad CFX96 RT-PCR з лінійним підвищенням температури від 25 °C до 95 °C та вимірювали зміну флуоресценції у часі. Обчислювали T_m як нижню точку першої похідної кривої плавлення. Усі варіанти мали виміряні значення T_m від 76 до 78 °C, що погоджується з виміряним T_m для Fab EBI-029 дикого типу (wt), рівним 76 °C.

Для вимірювання агрегації, зразки оцінювали методом ексклюзійної хроматографії з багатокутним розсіюванням лазерного світла (SEC-MALS) з використанням системи BEPX Agilent 1260, поєднаної з інструментом для вимірювання світлорозсіювання Wyatt miniDawn TREOS та інструментом для вимірювання показника заломлення Wyatt Optilab rEX. Вводили ін'єкцією 20–100 мкг білка та аналіз проводили при швидкості подачі 1 мл/хв. Усі варіанти мали молекулярну вагу від 45000 до 52000 Да при вимірюванні методом світлорозсіювання, що узгоджується з Fab EBI-029 дикого типу (wt).

Ці результати показують, що EBI-030 має досить гарні характеристики порівняно з EBI-029 з погляду властивостей, подібних до лікарських засобів.

Приклад 18: Проформування повнорозмірних антитіл IgG2 EBI-029 та EBI-030 та антитіл IgG2 з мутантними Fc-доменами

Переформатування EBI-029 та EBI-030 на IgG2 та IgG2 з мутантним Fc

Варіабельні домени важкого ланцюга EBI-029 та EBI-030, що включають лідерну послідовність (MDWTWRILFLVAAATGAHS; SEQ ID NO:49), ампліфікували методом ПЛР з Fab-векторів з використанням праймерів, якими вводили N-кінцевий сайт EcoRI та C-кінцевий сайт NheI. Продукти ПЛР очищали на 1 % агарозному гелі та проводили подвійний гідроліз EcoRI-HF та NheI-HF. Вектори основного ланцюга на основі pTT5, що містять послідовність важкого ланцюга IgG2 дикого типу або варіант домену IgG2 з мутацією H311A (H311 відповідає

нумерації в SEQ ID NO:41; це відповідає H310 в нумерації, використуваний Martin et al., Molecular Cell, 7:4, 867-877 (2001)) аналогічно гідролізували EcoRI-FH/NheI-HF та очищали на 1 % агарозному гелі. Вставки лігували в гідролізований основний ланцюг з використанням ферменту Quikligase (New England Biolabs), трансформували в клітини TOP10 (Life Technologies), та селекували на середовищі Ленгмюра-Блоджетт з ампіциліном (LB-Amp). З клонів виділяли ДНК за допомогою набору miniprep та секвенували для підтвердження вставки. Мутація H311A була вибрана для зниження афінності зв'язування Fc по відношенню до FcRn з метою зниження системного накопичення молекул, що залишають очну тканину.

Експресія та очистка варіантів IgG2 транз'єнтною трансфекцією

EBI-029 IgG2, EBI-029 IgG2-H311A, EBI-030 IgG2, та EBI-030 IgG2-H311A експресували методом транз'єнтної трансфекції в клітинах HEK-6E. Вектори pTT5, що містять кожен важкий ланцюг, піддавали котрансфекції плазмідом EBI-029 LC з використанням PEI як реагенту трансфекції. Супернатанти збирали через 5 днів та експресовані молекули IgG2 очищали методом афінної хроматографії з використанням агарози з білком А. Для очищеного білка проводили заміну буфера на ФСБ, pH 7,4, шляхом декількох циклів концентрування/розведення і концентрацію та чистоту білка визначали за поглинанням при 280 нм та методом ДСН-ПААГ.

Одержання стабільного пулу CHO

Стабільні пули клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO), що продукують EBI-029 IgG2, EBI-030 IgG2 або EBI-030 IgG2-H311A, були одержані з використанням набору Freedom CHO-S (Life Technologies) відповідно до інструкцій виробника. Стисло, кожен важкий ланцюг клонували шляхом стандартного гідролізу/лігування у вектор pCHO 1.0 в комбінації з EBI-029 LC. Конструкти трансфекували в клітини CHO-S з використанням реагенту Freestyle MAX та стабільні пули селекували зростаючими концентраціями пуроміцину та метотрексату (MTX). Після двох раундів селекції, пули піддавали скринінгу на продукування антитіла методом аналітичної хроматографії на білку А і найкращі продуценти були вибрані для масштабування та субклонування.

Послідовності представлені нижче.

Поліпептидна послідовність важкого ланцюга 030 (в каркасній ділянці IgG2, CDR підкреслені):

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGGGTINY
AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV
SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSV VTPVSSNFGT QTYTXHBDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
FRVSVLTVV HQDWLNGKEY CKKVSNNKGLP APIEKTISK KGQPREPVY TLPPSREEMT
KNQVSLTCLV KGFYPSDIIV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:41)

Поліпептидна послідовність легкого ланцюга 030 (в каркасній ділянці IgG2, CDR підкреслені):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCREASESD NYGIPFMNWX QKPKGQPPKL LIYAASNRGS
GVNDFPFGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPL IFGQGTKEI KRTVAAPSVF
IFPPSDEQLK SGASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL
STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:42)

Послідовність нуклеїнової кислоти важкого ланцюга 030:

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGTAT
CTTGTAAGCGTCTGGTTACGTCCCTTCCAACTACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCCCGG
CCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACCAACCCCTGGGGGCCGACCATTAATTACGCCAGAA
ATTTACAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCACTACTGCCTACATGGAGCTGTCC
TCACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGGAGTCGATGGGACCCCTCTTACT
ATTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCTGCTAGCACCAAGGG
CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGAC
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCCACCGTGCCAG
CACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAAACCCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCA
GTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCGAGACTGGCTGAACGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC

AAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG
ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
5 TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAA SEQ ID NO:43

Послідовність нуклеїнової кислоти легкого ланцюга 030:

GACATAGTGATGACTCAAAGTCCGGACAGCCTGGCGGTGTCACTCGGCGAACGGGGCAACTA
TCAACTGCCGAGCCAGCGAGAGCGTCGATAATTACGGCATCCCCCTTCATGAACTGGTATCAGCA
10 GAAGCCAGGACAGCCGCCCAAGCTGCTTATCTACGCCGCTTCCAACCGGGGATCAGGGGTGCC
CGATCGATTTAGTGGAAGCGGTAGTGGGACCGATTTCACTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCC
GAGGATGTGGCTGTCTATTATTGTACGCAATCCGAGGAAGTCCCGCTCAGCTTTGGTCAGGGAA
CCAAACTGGAGATCAAGCGGACCGTAGCGGCGCTAGTGTCTTCTATCTCCACCTCCGACGA
ACAGCTGAAGTCTGGCACTGCTTCCGTCGTGTGCCTGCTCAACAACCTTTTACCCTAGAGAGGCAA
15 AAGTTCAATGGAAAGTAGACAATGCCTTGCACTCCGGGAACCTCCAGGAGTCTGTACAGAGCA
GGATAGTAAGGACTCAACCTACAGCCTGTCCAGCACACTGACCCTCTCCAAAGCCGACTACGAG
AAGCACAAAGTGACGCTTGCAGAGTTACGCATCAGGGGCTGTCTCACCCGTTACAAAAAGTTT
TAACAGAGGGGAGTGCSEQ ID NO:44

Поліпептидна послідовність важкого ланцюга 030 з мутацією H311A (311A виділений
20 жирним шрифтом і CDR підкреслені), яка також називається в даному документі поліпептидною
послідовністю важкого ланцюга 031:

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TPPGGGTINY
AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV
SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
25 SSGLYSLSSV VTPPSSNFGT QTYTXHBDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
FRVVSVLTVV **AQDWLNGKEY** KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPVY TLPPSREEMT
KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:47)

Послідовність нуклеїнової кислоти важкого ланцюга 031:

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGTAT
CTTGTAAGCGTCTGGTTACGTCCTTCCAACTACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCCCGG
CCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACCACCCCTGGGGGCGGCACCATTAATTACGCCAGAA
ATTTACAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCACTGCTACATGGAGCTGTCC
35 TCACTCCGACGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGAGTTCGATGGGACCCCTTTACT
ATTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCTACTGTACACCAAGGG
CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGAC
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
40 GTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCCACCGTGCCAG
CACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCA
45 GTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTGCAGCGTCTCACCGTCTGGCCAGGACTGGCTGAACGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG
ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCG
50 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAA (SEQ ID NO:48)

Приклад 19: Порівняння ефективності EBI-030 та EBI-029 IgG2 в аналізі HEK-Blue-IL6

Лінія репортерних клітин HEK-Blue™ IL6 (Invivogen) була використана для порівняння
55 ефективності інгібування сигналізу IL6 між антитілами EBI-029 та EBI-030 IgG2. Порівнювали
три препарати (preps) очищеного білка з клітин HEK-6E– EBI-029 IgG2, EBI-030 IgG2 та EBI-030
IgG2-H311A (також називається 031 або EBI-031), разом з препаратом EBI-030 IgG2,
продукованого в стабільному пулі клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO). Додатково,
тоцилізумаб, який є схваленим антитілом проти IL6R, був включений як контроль. Для
60 вимірювання антагонізму IL6, людський IL-6 (R&D Systems 206-IL-010/CF) в концентрації 400 пМ

змішували з різними концентраціями кожного антитіла на 96-лунковому планшеті та інкубували при кімнатній температурі (RT) протягом 30 хвилин. Клітини HEK-Blue™ IL6 на логарифмічній фазі росту трипсинізували та ресуспендовали в середовищі для аналізу (ДМНМ, 4,5 г/л глюкози, 10 % термоінактивованої сироватки плоду корови (СПК), 2 мМ L-глутаміну, пеніцилін-стрептоміцин (Pen-Step)) при 280000 клітин/мл. Додавали в кожну лунку IL-6/Fab сумішей 180 мкл суспензії клітин для доведення кінцевої концентрації IL-6 до 20 пМ. Клітини інкубували при 37 °C/5 % CO₂ протягом 20 годин. Потім змішували 20 мкл супернатанта з кожної лунки з 180 мкл реагенту Quanti-Blue™ (Invivogen) та інкубували при 37 °C протягом 40 хвилин перед вимірюванням поглинання при 650 нМ на планшет-ридері SpectraMax M5.

Результати представлені на Фіг. 8 та у Таблиці 5. EBI-030 (включаючи EBI-030, продукований у HEK-клітинах, з мутацією H311A або без неї, та EBI-030, продукований у клітинах CHO) показали значно покращену ефективність (зниження IC₅₀ у приблизно 50 разів та зниження IC₉₀ у >100 разів) порівняно з EBI-029. Зростання ефективності було більшим, ніж зростання афінності, виміряне методом ППР.

Таблиця 5

Значення IC ₅₀ та IC ₉₀		
	IC ₅₀ (пМ)	IC ₉₀ (пМ)
EBI-029	47	4350
EBI-030	0,9	1,1
EBI-030 CHO	1,4	11
EBI-030-H311A	0,6	12,4
Тоцилізумаб	1490	23700

EBI-031 (також називаний в даному документі EBI-030 IgG2-H311A) мав величину IC₅₀, більш ніж у 75 разів меншу за EBI-029, і IC₉₀, приблизно у 350 разів меншу, за EBI-029. EBI-030, продукований у клітинах HEK, мав IC₅₀, більш ніж у 50 разів меншу за EBI-029, і IC₉₀, приблизно у 4000 разів меншу за EBI-029.

Приклад 20: Математичне моделювання підвищеної ефективності на тривалість блокади IL-6 у склистому тілі (vitreal)

Вплив підвищеної ефективності на ступінь та тривалість блокади IL-6 після інтравітреального введення був змодельований з використанням фармакокінетичної моделі (Фіг. 9). Диференційні рівняння, що описують зміни вільного антитіла (A), вільного IL-6 (IL), та комплексу антитіло/IL-6 (AIL), мали такий вигляд:

$$\begin{aligned} d/dt(A) &= -A \cdot k_{ae} - A \cdot IL \cdot k_1 + AIL \cdot k_2 \\ d/dt(IL) &= k_{pi} - IL \cdot k_{ie} - A \cdot IL \cdot k_1 + AIL \cdot k_2 \\ d/dt(AIL) &= -AIL \cdot k_{aie} + A \cdot IL \cdot k_1 - AIL \cdot k_2 \end{aligned}$$

де k_{ae} позначає швидкість кліренсу вільного антитіла зі склистого тіла, k_1 позначає швидкість асоціації для зв'язування антитіло/IL-6, k_2 позначає швидкість дисоціації для комплексу антитіло/IL6, k_{pi} позначає швидкість продукування IL-6, k_{ie} позначає швидкість кліренсу вільного IL-6 зі склистого тіла, і k_{aie} позначає швидкість кліренсу комплексу антитіло/IL-6 зі склистого тіла. Були визначені вихідні значення параметрів та швидкості, наведені у Таблиці 6.

Таблиця 6

Вихідні значення параметрів та швидкостей

Параметр	Значення
Вихідна концентрація антитіла - A ₀	3000 нМ
Вихідна концентрація IL-6-IL ₀	0,01 нМ
Вихідна концентрація комплексу - AIL ₀	0
Швидкість асоціації – k ₁	8,64 нМ ⁻¹ день ⁻¹
Швидкість дисоціації – k ₂	від 0,0086 день ⁻¹ до 0,86 день ⁻¹
Швидкість кліренсу антитіла – k _{ae}	0,037 день ⁻¹
Швидкість кліренсу IL6 – k _{ie}	0,69 день ⁻¹
Швидкість продукування IL6 – k _{pi}	0,0069 нМ день ⁻¹
Швидкість кліренсу комплексу – k _{aie}	0,037 день ⁻¹

A_0 розраховували на основі припущень про дозу 50 мкл 50 мг/мл антитіла в око людини з об'ємом склистого тіла (vitreal) 5 мл. IL_0 оцінювали на основі клінічно вимірних значень IL-6 у склистому тілі пацієнтів з ДМН ~200 пг/мл. k_1 оцінювали на основі типових швидкостей асоціації антитіл $1E5 M^{-1} s^{-1}$, у той час як величина k_2 змінювалася для імітації значень ефективності в діапазоні від 100 пМ до 1 пМ. k_{ie} визначали з вимірних періодів напіввиведення зі склистого тіла кроля, які дорівнювали приблизно 11 днів, з коефіцієнтом 1,8, як було раніше виміряно для фармакокінетичних параметрів людини. k_{ie} визначали для періоду напіввиведення 24 години, і k_{ie} обчислювали як $IL_0 \cdot k_{ie}$.

Імітацію вільного антитіла та вільного IL-6 здійснювали з використанням прикладної програми Berkeley Madonna за період дії лікарського засобу 300 днів (Fig. 10). Для вимірювання тривалості інгібування було вибране порогове значення блокади IL-6 95 %. Модель прогнозує, що зростаюча ефективність антитіла значно збільшує тривалість інгібування IL-6 в оці з 130 днів для $k_2/k_1=100$ пМ до 200 днів для $k_2/k_1=10$ пМ і до 225 днів для $k_2/k_1=1$ пМ.

Приклад 21: Фармакокінетика IL-6а

Фармакокінетичні (PK) експерименти на самцях новозеландських білих кролей проводила фірма PharmOptima (Portage, MI). Усі тварини мали вік 12-13 місяців та вагу 2,61-3,42 кг. Проводили порівняння наступних білків – EBI-029-IgG2 (SEQ ID NO:11 та SEQ ID NO:12), EBI-029-IgG2-H311A (SEQ ID NO:10 та SEQ ID NO:12), EBI-030 (SEQ ID NO:41 та SEQ ID NO:42), EBI-030-IgG2-H311A (SEQ ID NO:47 та SEQ ID NO:42), EBI-029 Fab (SEQ ID NO:24 та SEQ ID NO:12), Eylea® (пастка VEGF), та тоцилізумаб (TCZ; антитіло проти IL6R). Композиції усіх білків були складені з концентрацією 13,8 мг/мл в ФСБ, pH 7,4. EBI-029-IgG2, EBI-029-IgG2-H311A, EBI-030, EBI-030-IgG2-H311A, EBI-029 Fab, та тоцилізумаб не зв'язувалися з їх антигенами-мішенями у кроля, у той час як Eylea® зв'язувався з VEGF кроля.

Для досліджень інтравітреальної фармакокінетики (PK), 9 тваринам вводили ін'єкцією 50 мкл досліджуваного препарату в кожне око. Перед ін'єкцією, на поверхню ока наносили лідокаїну гідрохлорид (для ін'єкцій, 2 %), 0,5 % пропаракаїну, або 0,5 % тетракаїну. Ін'єкції робили в середню частину склистого тіла інсуліновим шприцем BD 300 мкл (голка 31G × 8 мм (5/16 дюйма)), введенням через задньоскроневий (dorsotemporal) квадрант ока. Для досліджень системної фармакокінетики, 3 тваринам робили ін'єкції 100 мкл досліджуваного препарату у вушну вену.

Серійні зразки крові брали у 3 тварин з гілок як інтравітреального (IVT), так і внутрішньовенного (iv) введення в моменти часу 0,083, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 240 та 336 годин, та розводили 1:1 цитрат-фосфат-декстрозним розчином і поміщали на лід. Плазму збирали центрифугуванням охолоджуваних зразків крові при 4000 об/хв протягом 10 хвилин при 4 °C та зберігали замороженою при -80 °C.

Очні тканини брали з обох очей усіх тварин у гілці інтравітреального (IVT) введення в моменти часу 0,25, 24, 168 та 336 годин після введення дози. Тварин умертвляли внутрішньовенним передозуванням барбітурату. Для збирання водянистої вологи, одразу після евтаназії шприц з голкою вводили під рогівку та повільно відбирали водянисту вологу. Водянисту вологу переносили в попередньо помічену пробірку та поміщали на сухий лід або заморожували при -80 °C. Для збирання рідини склистого тіла, робили маленький зріз у склері вилученого ока за допомогою скальпеля і склисте тіло відбирали шприцем через отвір. (Об'єм) зразка визначали за допомогою поділок на шприці, переносили в попередньо помічену пробірку та поміщали на сухий лід або заморожували при -80 °C.

Для відбору сітківки та судинної оболонки, робили маленький зріз у склері вилученого ока за допомогою скальпеля, паралельно та ближче до хвостової частини (caudal) лімба рогівки. Використовували ножиці для продовження отвору навколо окружності ока, розділяючи його на дві половинки. Задню півкулю (globe) поміщали внутрішньою частиною угору. За допомогою офтальмологічного ножа gill knife, обережно збирали сітківку з півкулі. Після того, як сітківка була зібрана з півкулі, аналогічно збирали з решти судинну оболонку. Обидва зразки, окремо, переносили до попередньо зважених та попередньо помічених пробірок Precellys®, зважували, та поміщали на сухий лід або заморожували при -80 °C. Тканини сітківки та судинної оболонки розводили десятикратно фосфатно-сольовим буфером (ФСБ), гомогенізували та зберігали при -80 °C.

Концентрації білка у кожній тканині оцінювали методом ELISA. Для EBI-029-IgG2, EBI-029-IgG2-H311A, EBI-030, EBI-030-IgG2-H311A, та EBI-029 Fab, на планшети Costar половинного об'єму покривали 1 мкг/мл людського IL-6 в ФСБ протягом 1 години при кімнатній температурі. Лунки блокували за допомогою ФСБ, що містить 2 % БСА, промивали, і потім інкубували з діапазоном розведень для кожного зразка, використовуючи ФСБ + 5 % плазма кроля + 0,05 % Tween-20 як розріджувач. Кожен планшет включав також калібрувальну криву з використанням

очищеного білка. Зразки інкубували при кімнатній температурі (RT) протягом 60 хвилин, потім промивали три рази 300 мкл ФСБ, що містить 0,05 % Tween-20. Потім додавали в кожну лунку анти-каппа-HRP (Genway Inc.), розведену 1:10000 в ФСБ, 1 % БСА, 0,05 % Tween-20, та інкубували протягом 30 хвилин. Лунки промивали, як описано вище, а потім додавали субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) та вимірювали сигнал при 450 та 550 нм за допомогою планшет-ридера Spectramax. Концентрації білка розраховували за допомогою калібрувальної кривої з використанням прикладної програми Softmax Pro 6. Кожен аналіз ELISA повторяли на щонайменше 3 незалежних планшетах і реєстрували середній період напіввиведення.

Для тоцилізумабу, концентрації білка визначали методом ELISA, як вказано вище, за винятком того, що анти-тоцилізумаб-Fab (BioRad HCA252) використовували як реагент захоплення і антилюдський IgG-Fc-HRP (Sigma A0170) використовували як антитіло для детектування. Два різні аналізи ELISA використовували для вимірювання вільного та загального Eylea®. Для вільного Eylea®, лунки покривали рекомбінантним VEGF (R&D Systems) і зв'язаний білок детектували за допомогою антилюдського IgG-Fc-HRP (Sigma A0170). Для вимірювання загального Eylea®, антилюдське Fc-антитіло (Sigma I2136) використовували для захоплення і антилюдський IgG-CH2-HRP (BioRad MCA647P) використовували для детектування. Кожен аналіз ELISA повторяли на щонайменше 3 незалежних планшетах і реєстрували середній період напіввиведення.

Стислий виклад результатів

У більшості тварин, сильне утворення антитіла проти введеного білка спостерігали в моменти часу 240 та 336 годин. Оскільки це утворення антитіла може впливати на кліренс білка або перешкоджати проведенню ELISA, аналіз даних був обмежений моментами часу до 168 годин включно. Для інтравітреальної фармакодинаміки, усі білки EBI-029 та EBI-030 IgG2 виводилися значно повільніше ($T_{1/2}$ =9,3, 9,0, 15,7 та 9,8 днів для EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030, та EBI-030-H311A, відповідно) у порівнянні з Eylea® ($T_{1/2}$ =6,3 днів), тоцилізумабом ($T_{1/2}$ =4,8 днів), або Fab-фрагментом EBI-029 ($T_{1/2}$ =3,9 днів) (Фіг. 11, Таблиця 7). Аналогічні тенденції спостерігали у сітківці, судинній оболонці, та волозі, де EBI-030 та EBI-030-H311A накопичувалися в більш високих рівнях порівняно з Eylea® та тоцилізумабом (див. Фіг. 12 та Фіг. 13). Усі білки були детектовані в плазмі після інтравітреального (IVT) введення, причому EBI-029, EBI-030 та тоцилізумаб накопичувалися зі значно вищими рівнями, ніж Eylea® або EBI-030-H311A (див. Фіг. 14). Аналогічно, Eylea® та EBI-030-H311A виводилися швидше з плазми після внутрішньовенного (IV) введення, причому період напіввиведення EBI-030-H311A складав приблизно половину від показників для IgG2 дикого типу внаслідок зниженого зв'язування з FcRn (Таблиця 7).

Таблиця 7

Фармакокінетичні результати

Фармакокінетика у склистому тілі	
Молекула	$T_{1/2}$ (днів)
EBI-029	9,3
EBI-029-H311A	9,0
EBI-030	15,7
EBI-030-H311A	9,8
EBI-029 Fab	3,9
Eylea®	6,1 (вільний), 6,3 (загальний)
Тоцилізумаб	4,8
Системна фармакокінетика після внутрішньовенного введення	
Молекула	$T_{1/2\beta}$ (годин)
EBI-029	77
EBI-030	69
EBI-030-H311A	33
Eylea®	37 (вільний), 42 (загальний)
TCZ (Тоцилізумаб)	50

Приклад 22: Розчинність EBI-031 при високих концентраціях

Очищений EBI-031 концентрували з 3 мг/мл до 142 мг/мл в ФСБ, pH 7,4, з використанням концентратора-центрифуги Amicon Ultra-15. Препарати до та після концентрування аналізували

на агрегацію шляхом пропускання через колонку Tosoh G3000SWXL 7,8×30 SEC, спряжену з інструмента для визначення світлорозсіювання Wyatt miniDawn TREOS та інструмента для визначення показника заломлення Wyatt Optilab rEX. Впорскували 20 мкг білка та елюювали при швидкості потоку 1 мл/хв в ФСБ. Масова частка піка з очікуваною молекулярною вагою близько 150 кДа була приблизно однаковою для двох концентрацій (90,9 % для 3 мг/мл і 91,3 % для препарату 142 мг/мл), вказуючи на те, що під час концентрування не відбувалося значного зростання агрегації білка. Ці результати демонструють, що EBI-031 може бути сконцентрований до 142 мг/мл з незначною вимірною агрегацією (агрегація <10 %).

Приклад 23: EBI-031 блокує цис- та транс-сигналінг IL6

Лінію репортерних клітин HEK-Blue™ IL6 (Invivogen) використовували для порівняння ефективності EBI-031 та тоцилізумабу у блокуванні цис- та транс-сигналіngu IL6. Для цис-сигналіngu, вільний IL-6 (кінцева концентрація = 20 пМ) змішували з EBI-031 або тоцилізумабом в діапазоні концентрацій на 96-лунковому планшеті та інкубували при кімнатній температурі (RT) протягом 30 хвилин. Клітини HEK-Blue™ IL6 на логарифмічній фазі росту трипсинізували та ресуспендували в середовищі для аналізу (ДМНМ, 4,5 г/л глюкози, 10 % термоінактивованої сироватки плоду корови (СПК), 2 мМ L-глутаміну, пеніцилін-стрептоміцин (Pen-Step)), і 50000 клітин додавали в кожен лунку в кінцевому об'ємі 200 мкл. Планшети інкубували при 37 °C/5 % CO₂ протягом 20 годин. Потім змішували 50 мкл супернатанта з кожною лункою зі 150 мкл реагенту Quanti-Blue™ (Invivogen) та інкубували при 37 °C протягом 40 хвилин перед вимірюванням поглинання при 650 нМ на планшет-ридері SpectraMax M5. Віднімали фоновий сигнал для лунки без IL-6 і потім ділили на (сигнал) для клітин, оброблених IL-6 без інгібітора, одержуючи відносне значення сигналіngu. EBI-031 (IC₅₀=14,2 пМ) блокує вільний IL-6 з ефективністю, яка перевищує тоцилізумаб (IC₅₀=12,9 нМ) у >900 разів (Фіг. 16A).

Для вимірювання блокади транс-сигналіngu, експерименти проводили, як описано вище, за винятком використання гіпер-IL-6 в кінцевій концентрації 200 пМ замість вільного IL-6. Гіпер-IL-6 є (продуктом) генетичного злиття між IL-6 та розчинним рецептором IL-6 (Fischer et al., Nature Biotechnology 15:142-145 (1997)). EBI-031 сильно блокував гіпер-IL-6 (IC₅₀=32 пМ), у той час як тоцилізумаб був нездатним істотно інгібувати сигналінг до концентрації 1 мкМ (Фіг. 16B).

Ці результати показують, що EBI-031 зв'язується з людським IL-6 в сайті II, або сайті, що контактує з gp130, з пікомолярною афінністю, і блокує сигналінг IL-6 та комплексу IL-6/sIL-6Rα в клітинних аналізах в >900 разів сильніше, ніж тоцилізумаб.

Приклад 24: Математичне моделювання пригнічення сигналіngu IL-6 інтравітреальним EBI-031

Математичне моделювання проводили, як описано у Прикладі 20, для прогнозування тривалості часу, протягом якого інтравітреальне введення EBI-031 людям має пригнічувати 95 % сигналіngu IL-6. Величина k₂ була взята рівною 0,12 день⁻¹, так щоб k₂/k₁=14 пМ за результатами вимірювання в аналізі ефективності. T_{1/2} кліренсу був узятий рівним 18 днів на основі вимірюного періоду напіввиведення при інтравітреальному кліренсі у кролів, з коефіцієнтом 1,8 для людей. Решта параметрів описані у Таблиці 6. Модель прогнозує, що EBI-031 повинен блокувати 95 % сигналіngu IL-6 протягом приблизно 150 днів після інтравітреального введення (Фіг. 17). Ці результати моделювання показують, що EBI-031 може по суті блокувати сигналінг IL-6 в оці протягом тривалого періоду часу, наприклад, до приблизно 6 місяців.

Приклад 25: Характеризація ізоформ EBI-031

EBI-031 є антитілом IgG2. Як було описано раніше, антитіла IgG2 існують у вигляді трьох різних структурних ізоформ - IgG2-A, IgG2-B та IgG2-A/B (Фіг. 18). В цьому прикладі, були проведені експерименти для ідентифікації структурних ізоформ у зразках EBI-031.

Аналіз ОФ-ВЕРХ

Обернено-фазовий високоефективний рідинний хроматограф (ОФ-ВЕРХ) використовували для розрізнення різних структурних ізоформ EBI-031. Удосконалений аналітичний метод ОФ-ВЕРХ, який був раніше використаний для розрізнення дисульфід-медіюваних структурних ізоформ IgG2 (див. Dillon et al., Journal of Chromatography A, 2006, 1120:112-120), був оптимізований для розрізнення EBI-031.

Зразки EBI-031, що містять приблизно 30 мкг, завантажували на колонку Zorbax 300SB-C8 (150 мм × 2,1 мм, 5,0 мкм, 300 Å). Температура колонки була задана рівною 75 °C. Рухомою фазою А була вода, що містить 0,1 % трифтороцтової кислоти (TFA), і рухомою фазою В була суміш 55 % ізопропилового спирту (IPA), 40 % ацетонітрилу (ACN), 4,9 % води та 0,1 % TFA. Швидкість потоку становила 0,5 мл/хв. Колонку спочатку врівноважували сумішшю 90 % рухомої фази А та 10 % рухомої фази В протягом 2 хв з подальшою 2 хв стадією градієнта від 10 до 25 % В. Елюювання проводили лінійним градієнтом 25–32 % В на протязі 21 хв. УФ-поглинання

контролювали на 214 нм та/або 280 нм.

Для визначення того, чи було розрізнення пов'язане з дисульфідними зв'язками, зразки обробляли 5 мМ дитіотреїтолу (DTT) та 10 мМ цистеїну при кімнатній температурі протягом 2 хв і потім аналізували методом ОФ-ВЕРХ (Фігура 19). Обробка DTT, який є сильним відновним агентом, спричинювала відновлення антитіла IgG2, приводячи до елюювання в ранніх піках (Пік 0 та Пік 1) (Фігура 19, середня панель). Обробка цистеїном, який є більш м'яким відновним агентом у порівнянні з DTT, також зсуває розподіл ізоформ в напрямку до ранніх піків (Пік 0 та Пік 1), хоча й не в такому ступені, як у зразка, обробленого DTT (Фігура 19, нижня панель).

Дані демонструють, що метод ОФ-ВЕРХ розрізняє структурні ізоформи з різною дисульфідною зв'язністю. Різні структури дисульфідних зв'язків були підтверджені картуванням невідновленого пептиду та мас-спектрометричним аналізом: ранній елюований пік (Пік 1) містить ізоформу IgG2-A/B, а пізній елюований пік (Peak 2) містить ізоформу IgG2-A. Важливо відзначити, що ізоформа B IgG2-B (Пік 0) не детектувалася в зразку EBI-031 (Фігура 19, верхня панель).

Порівняння різних зразків EBI-031

З використанням аналізу ОФ-ВЕРХ, описаного вище, зразки EBI-031, зібрані від різних клітинних ліній, що експресують EBI-031, були проаналізовані для порівняння розподілу ізоформ продукованих антитіл. Зразки EBI-031 збирали з 200-литрової культури клональної клітинної лінії, 10-литрової культури батьківської клітинної лінії, та пулу стабільно трансфектованих клітин. EBI-031 із клональної та батьківської клітинних ліній, що експресують EBI-031, очищали з використанням тристадійного хроматографічного методу. EBI-031 із пулу стабільно трансфектованих клітин очищали методом очистки з білком А. Зразки аналізували способами, описаними вище.

Результати, представлені на Фігурі 20, показують, що усі три зразки EBI-031 містили ізоформи IgG2-A та IgG2-A/B, але без істотних кількостей IgG2-B. Ці дані демонструють, що антитіло IgG2 EBI-031 продукується в менш гетерогенній суміші, ніж інші антитіла IgG2, незалежно від того, чи продукування відбувається в клональній клітинній лінії, що експресує EBI-031, батьківській клітинній лінії, що експресує EBI-031, або в гетерогенній популяції клітин, що стабільно експресує EBI-031. Фігура 21 показує розподіл ізоформ, одержаних від зразка EBI-031 з 200-литрової культури клональної клітинної лінії, що експресує EBI-031, тобто, з верхньої панелі Фігури 20. Були також виміряні площі під кривими, і розподіли ізоформ вказані у таблиці під Фігурою.

Приклад 26: Фармакокінетика за результатами досліджень на приматах

Фармакокінетику EBI-031 вивчали шляхом проведення досліджень на приматах. Тестування проводили на двох самцях африканських зелених мавп. 50 мкл 50 мг/мл EBI-031 вводили в око інтравітальною ін'єкцією. Для апроксимації кривих використовували прикладну програму Madonna.

Дані досліджень на приматах моделювали з використанням апроксимації кривих. Диференційні рівняння, що описують зміни вмісту антитіла у склистому тілі (A) та антитіла поза склестим тілом, наприклад, системного, (Ap), мали такий вигляд:

$$d/dt(A) = -A \cdot k_{ae}$$

$$d/dt(A_p) = A \cdot k_{ae}(Dil) - A_p \cdot k_{pe}$$

Вихідні значення параметрів та швидкості вказані у таблиці нижче:

Таблиця 8

Значення вихідних параметрів та швидкостей

Параметр	Значення
Dil – Розведення	100
k _{ae} – Швидкість виведення із склистого тіла	0,2
k _{pe} – Швидкість системної елімінації	1,4
Init A – Початковий вміст антитіла в склистому тілі	1000000
Init A _p – Початковий вміст антитіла поза склестим тілом	0

Інші міркування, що враховувалися при апроксимації, включають: ступінь розведення та обидві константи швидкості (rate constant) мали змінні значення для апроксимації. Вихідне значення A біло постійним (2×50 мл 50 мг/мл в око об'ємом 5 мл). Результати моделювання, представлені на Фіг. 22A, 22B та 23, показують, що константи швидкості елімінації зі склистого тіла давали величини періодів напіввиведення 4,6 та 5,7 днів, відповідно, для двох мавп.

Середня константа швидкості елімінації зі склистого тіла була розрахована рівною 5,2 днів. Системна елімінація за результатами моделювання становила 1,1 днів, та 0,63 днів (середнє 0,85 днів). Ці результати демонструють, що період напіввиведення EBI-031 у склистому тілі був значно більшим, ніж системний період напіввиведення у приматів.

5 Приклад 27: Фармакокінетика EBI-031

Був проведений інший фармакокінетичний (РК) експеримент, в якому 50 мкл 20 мг/мл розчину EBI-031 вводили ін'єкцією інтравітреально в очі кролей. Аналізованими моментами часу були 1, 3, 7 та 14 днів (тобто, 24, 72, 168 та 336 годин). Дві тварини (чотири ока) аналізували для кожного моменту часу. Методи введення композиції EBI-031, відбирання очної тканини, та визначення концентрації білка були такими, як описано у Прикладі 21.

10 Результати представлені на Фігурах 24А-24І. При аналізі концентрації білка в дні 1-14 у рідині склистого тіла, період напіввиведення EBI-031 був визначений рівним 8,95 днів (Фіг. 24А). Однак, в День 14 детектували сильну гуморальну імунну відповідь, яка може впливати на ці результати. При аналізі концентрації білка в дні 1-7 у рідині склистого тіла, період напіввиведення EBI-031 був визначений рівним 18,88 днів.

15 EBI-031 був також детектований в інших компартментах ока після інтравітреальної ін'єкції. EBI-031 також проникав до водянистої вологи (Фіг. 24В), судинної оболонки (Фіг. 24С), кон'юнктиви (Фіг. 24D), рогівки (Фіг. 24Е), війкового тіла (Фіг. 24F), кришталика (Фіг. 24G), сітківки (Фіг. 24H) та склери (Фіг. 24I). Концентрація лікарського засобу в цих тканинах була на один-два
20 порядки величини нижче концентрації, детектованої у склистому тілі.

Інші варіанти реалізації входять до обсягу наведеної далі формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

25 <110> ЕЛЕВЕН БАЙОТЕРАПЬЮТІКС, ІНК.

<120> ПОКРАЩЕНІ ІL-6 АНТИТІЛА

<130> D2046-7061WO

30

<140> PCT/US2015/059532

<141> 2015-11-06

<150> 62/247,705

35

<151> 2015-10-28

<150> 62/087,448

<151> 2014-12-04

40

<150> 62/077,105

<151> 2014-11-07

<160> 54

45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 225

<212> PRT

50

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> Джерело інформації

<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

55

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1

5

10

15

UA 122673 C2

	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ser	Asn	Tyr	
				20					25					30			
5	Leu	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
10	Gly	Val	Ile	Thr	Pro	Gly	Ser	Gly	Thr	Ile	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
		50					55					60					
15	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
20	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
	Ala	Arg	Ser	Arg	Trp	Asp	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Glu	Tyr	Trp	
				100					105					110			
25	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	
			115					120					125				
30	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	
		130					135					140					
35	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
	145					150					155					160	
40	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
				165						170					175		
	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
			180						185					190			
45	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
			195					200					205				
50	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
		210					215					220					
55	Cys																
	225																

<210> 2

<211> 218
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 2
 10 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

15 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Ile Pro Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 20

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

25 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

30 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu
 85 90 95

35 Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 40

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

45 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

50 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

55 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195

200

205

5 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 3
<211> 225
10 <212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> Джерело інформації
15 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 3
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

20 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

25 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

30 Gly Val Ile Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

35 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

40 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
100 105 110

45 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

50 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

55 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

		165		170		175
5	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	180		185		190
10	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn	195		200		205
15	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser	210		215		220
	Cys	225				
20	<210> 4					
	<211> 10					
	<212> PRT					
	<213> Штучна послідовність					
25	<220>					
	<221> Джерело інформації					
	<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"					
30	<400> 4					
	Gly Tyr Ala Leu Ser Asn Tyr Leu Ile Glu	1	5		10	
35	<210> 5					
	<211> 10					
	<212> PRT					
	<213> Штучна послідовність					
40	<220>					
	<221> Джерело інформації					
	<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"					
45	<400> 5					
	Val Ile Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn	1	5		10	
50	<210> 6					
	<211> 13					
	<212> PRT					
	<213> Штучна Послідовність					
55	<220>					
	<221> Джерело інформації					
	<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"					
	<400> 6					
	Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr					

```

1                               5                               10

5   <210> 7
    <211> 15
    <212> PRT
    <213> Штучна Послідовність

    <220>
10  <221> Джерело інформації
    <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

    <400> 7
15  Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Pro Phe Met Asn
    1                               5                               10                               15

    <210> 8
    <211> 7
20  <212> PRT
    <213> Штучна Послідовність

    <220>
    <221> Джерело інформації
25  <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

    <400> 8
    Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser
    1                               5

30

    <210> 9
    <211> 9
    <212> PRT
35  <213> Штучна Послідовність

    <220>
    <221> Джерело інформації
    <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"
40

    <400> 9
    Gln Gln Ser Glu Glu Val Pro Leu Thr
    1                               5

45

    <210> 10
    <211> 448
    <212> PRT
    <213> Штучна Послідовність
50

    <220>
    <221> Джерело інформації
    <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

55  <400> 10
    Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
    1                               5                               10                               15

```

UA 122673 C2

	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ser	Asn	Tyr	
				20					25					30			
5	Leu	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
10	Gly	Val	Ile	Thr	Pro	Gly	Ser	Gly	Thr	Ile	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
		50					55					60					
15	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
20	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
	Ala	Arg	Ser	Arg	Trp	Asp	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Glu	Tyr	Trp	
				100					105					110			
25	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	
			115					120					125				
30	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	
		130					135					140					
35	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
	145					150					155					160	
40	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
					165					170					175		
	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
				180					185					190			
45	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	
			195					200					205				
50	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	
		210					215					220					
55	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	
	225					230					235					240	
	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	

UA 122673 C2

	245	250	255
5	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro 260 265 270		
10	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala 275 280 285		
15	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val 290 295 300		
20	Ser Val Leu Thr Val Val Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr 305 310 315 320		
25	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr 325 330 335		
30	Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu 340 345 350		
35	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys 355 360 365		
40	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser 370 375 380		
45	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp 385 390 395 400		
50	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser 405 410 415		
55	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala 420 425 430		
	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435 440 445		
	<210> 11		
	<211> 448		
	<212> PRT		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<221> Джерело інформації		

<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 11

5	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	1	5	10	15
10	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Leu Ser Asn Tyr	20	25	30	
15	Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	35	40	45	
20	Gly Val Ile Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	50	55	60	
25	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	65	70	75	80
30	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95	
35	Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp	100	105	110	
40	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro	115	120	125	
45	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr	130	135	140	
50	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr	145	150	155	160
55	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro	165	170	175	
	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	180	185	190	
	Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp	195	200	205	
	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys	210	215	220	

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 5
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 10 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 15 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
 290 295 300
 20
 Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 25
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 30 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 35 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 40
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 385 390 395 400
 45
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 50 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 55 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 12

<211> 218
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 12
 10 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

15 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Ile Pro Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 20

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

25 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

30 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu
 85 90 95

35 Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 40

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

45 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

50 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

55 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

UA 122673 C2

195

200

205

5 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 13
<211> 122
10 <212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 13
15 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Tyr
20 20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

25 Gly Val Ile Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

30 Lys Gly Lys Ala Val Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

35 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
100 105 110

40 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

45 <210> 14
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus sp.

50 <400> 14
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

55 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

5
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

10
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
65 70 75 80

15
Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

20
Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 15
<211> 122
<212> PRT
25 <213> Штучна послідовність

<220>
<221> Джерело інформації
<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний
30 поліпептид"

<400> 15
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

35
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

40
Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

45
Gly Val Ile Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

50
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

55
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 5
 <210> 16
 <211> 111
 <212> PRT
 10 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"
 15
 <400> 16
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 20
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 25 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 30 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 35
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 40
 Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 45 <210> 17
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"
 <400> 17
 55 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

5 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

10 Gly Val Ile Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

15 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

20 Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
100 105 110

25 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

30 <210> 18
<211> 114
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

35 <220>
<221> Джерело інформації
<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

40 <400> 18
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

45 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Pro Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

50 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

55 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu
85 90 95

5 Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val

10

<210> 19
<211> 452
15 <212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> Джерело інформації
20 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

25

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

35 Gly Val Ile Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

40 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

45

Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
100 105 110

50

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

55 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

UA 122673 C2

	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
	145					150					155					160	
5	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
				165						170					175		
10	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
				180					185					190			
15	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
			195					200					205				
20	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
		210					215					220					
25	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
					245					250					255		
30	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
				260					265					270			
35	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
			275					280					285				
40	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
		290					295					300					
45	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
	305					310					315					320	
50	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
					325					330					335		
55	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
				340					345					350			
60	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
			355					360					365				
65	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
		370					375					380					

UA 122673 C2

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 5
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 10
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 15
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 20
 Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 20
 <211> 1356
 25 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> Джерело інформації
 30 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний
 полінуклеотид"
 <400> 20
 caagtgcagc tgggtgcagtc aggggccgag gttaagaagc cagggagcag cgtcaaggta
 35 60
 tcttgtaaag cgtctgggta cgccttttca aactacctga tcgaatgggt gaggcaggct
 120
 40 cccggccaag gcctggaatg gatgggagtt atcacccttg ggagcggcac cattaattac
 180
 gcccagaaat ttcagggacg agtgacgatt accgccgacg agtccaccag tactgcctac
 240
 45 atggagctgt cctcactccg cagcgaggac acggcagttt actactgcgc ccggagtcga
 300
 tgggaccctc ttactatta tgctctggaa tactggggcc agggaacgac cgttacagtg
 50 360
 tcatctgcta gcacaaaagg accatcagtc ttcccacttg ctccttcac taagagcaca
 420
 55 agtgggtggca ctgcagccct tggctgcctg gtgaaagatt atttccccga acctgttaca
 480

gtttcttgga actccggtgc actgacatcc ggagtacaca ctttcccagc tgtgctgcag
540

agctcaggac tgtatagcct gtcttcggtg gtcactgttc catcgtcgag tcttggcaca
5 600

cagacatata tttgcaacgt caatcacaag ccctccaaca caaaagtga taagaaggtc
660

gagcccaaatt cttgtgacaa gaccatacgt tgtcctccct gtcccgcgcc tgaactgctg
10 720

ggaggccctt ctgtgttcct gttcccacct aagccaaagg acactctgat gatcagccgg
780

actcccgagg ttacctgtgt ggtggtggat gtgtctcatg aagaccctga ggttaagtgc
15 840

aattggtacg tggatggcgt cgagggtgcat aacgcaaaaa ccaagccgag agaggagcag
20 900

tacaatagca cctatagagt agtgagcgtc ctgactgtct tacatcagga ttggctcaat
960

ggtaaagaat ataagtgcaa ggtaagcaac aaggccctac ccgcaccaat agagaagacc
25 1020

atctccaagg cgaaagggtca gccaggggag cccaggttt atacactgcc tccctcagcg
1080

gacgaattaa caaagaatca ggtgtctctc acctgtctcg tcaagggctt ttacccttcc
30 1140

gacatcgccg tggagtggga atccaatggc cagcctgaga acaattataa gacaactccc
35 1200

ccagtcctgg attcagatgg gtcgttcttt ctatatagta agttgaccgt ggataagtct
1260

cgctggcaac aggggaacgt gttctcttgc tctgttatgc atgaagcgct gcacaatcat
40 1320

tataccaga agtccctgtc cctgagcccc gggaag
1356

45

<210> 21
<211> 212
<212> PRT
50 <213> Homo sapiens

<400> 21
Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
1 5 10 15

55

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
20 25 30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
 35 40 45
 5
 Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
 50 55 60
 10
 Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
 65 70 75 80
 15 Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
 85 90 95
 20 Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
 100 105 110
 Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
 115 120 125
 25
 Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
 130 135 140
 30
 Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
 145 150 155 160
 35 Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
 165 170 175
 40 Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His
 180 185 190
 Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala
 195 200 205
 45
 Leu Arg Gln Met
 210
 50
 <210> 22
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 55
 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний

поліпептид"

<400> 22

5	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	1	5	10	15
10	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	20	25	30	
15	Gly	Ile	Pro	Phe	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	35	40	45	
20	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Arg	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	50	55	60	
25	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	65	70	75	80
30	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Glu	85	90	95	
35	Glu	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	100	105	110	
40	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	115	120	125	
45	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	130	135	140	
50	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	145	150	155	160
55	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	165	170	175	
	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	180	185	190	
	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	195	200	205	
	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							210	215		

<210> 23
 <211> 448
 <212> PRT
 5 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний
 10 поліпептид"

 <400> 23
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Leu Ser Asn Tyr
 20 20 25 30
 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 25 Gly Val Ile Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 30 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
 100 105 110
 40 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 45 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 50 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 55 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	
			195					200					205				
5																	
	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	
		210					215					220					
10																	
	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	
	225					230					235					240	
15																	
	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
					245					250					255		
20																	
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
				260					265					270			
25																	
	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
			275					280					285				
30																	
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	
		290					295					300					
35																	
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
	305					310					315					320	
40																	
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
					325					330					335		
45																	
	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
				340					345					350			
50																	
	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
			355					360					365				
55																	
	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
		370					375					380					
60																	
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	
	385					390					395					400	
65																	
	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
					405					410					415		

UA 122673 C2

```

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
      420                      425                      430

5  Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435                      440                      445

10 <210> 24
    <211> 230
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність

    <220>
15  <221> Джерело інформації
    <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

    <400> 24
20  Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
      1              5              10              15

      Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Leu Ser Asn Tyr
      20              25              30

25  Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45

30  Gly Val Ile Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50              55              60

35  Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65              70              75              80

40  Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95

      Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
      100             105             110

45  Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
      115             120             125

50  Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
      130             135             140

55  Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
      145             150             155             160

```

UA 122673 C2

```

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
      165                      170                      175

5  Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
      180                      185                      190

10 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
      195                      200                      205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
      210                      215                      220

15 Cys Asp Lys Thr His Thr
      225                      230

20
<210> 25
<211> 327
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

25
<220>
<221> Джерело інформації
<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

30 <400> 25
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
1      5      10      15

35 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
      20      25      30

40 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
      35      40      45

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
      50      55      60

45 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln
      65      70      75      80

50 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
      85      90      95

55 Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
      100      105      110

```


UA 122673 C2

	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
			115					120					125				
5	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
		130					135					140					
10	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
	145					150					155					160	
15	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
					165					170					175		
20	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	
				180					185					190			
25	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	
			195					200					205				
30	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
		210					215					220					
35	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
	225					230					235					240	
40	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
					245					250					255		
45	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
			260						265					270			
50	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
			275				280						285				
55	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
		290					295					300					
60	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
	305					310					315					320	
65	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
					325												
70	<210>	26															
75	<211>	654															

```

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
5 <221> Джерело інформації
  <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний полінуклеотид"

<400> 26
10 gacatagtga tgactcaaag tccggacagc ctggcgggtgt cactcggcga acgggcaact
   60
   atcaactgcc gagccagcga gagcgtcgat aattacggca tccccttcat gaactgggtat
   120
   cagcagaagc caggacagcc gcccaagctg cttatctacg ccgcttccaa ccgggggatca
   15 180
   ggggtgcccg atcgatttag tggaagcggg agtgggaccg atttcacact gaccatcagc
   20 240
   tcccttcagg ccgaggatgt ggctgtctat tattgtcagc aatccgagga agtgccgctc
   300
   acgtttggtc agggaaccaa actggagatc aagcggaccg tagcggcgcc tagtgtcttc
   25 360
   atcttccac cctccgacga acagctgaag tctggcactg cttccgtcgt gtgcctgctc
   420
   aacaactttt accctagaga ggcaaaagtt caatggaaag tagacaatgc cttgcagtcc
   30 480
   gggaactccc aggagtctgt cacagagcag gatagtaagg actcaaccta cagcctgtcc
   35 540
   agcacactga ccctctccaa agccgactac gagaagcaca aagtgtacgc ttgcgaagtt
   600
   acgcatcagg ggctgtcctc acccgttaca aaaagtttta acagagggga gtgc
   40 654

<210> 27
<211> 122
45 <212> PRT
  <213> Штучна послідовність

<220>
<221> Джерело інформації
50 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 27
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1          5          10          15
55
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Leu Ser Asn Tyr
20          25          30

```

5 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 10 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 15 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 20 Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25
 <210> 28
 <211> 467
 <212> PRT
 30 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"
 35
 <400> 28
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 40 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 45 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Leu
 35 40 45
 50 Ser Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Val Ile Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 55 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 85 90 95

	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
				100					105					110			
5																	
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Arg	Trp	Asp	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Leu	
			115					120					125				
10																	
	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	
		130					135					140					
15																	
	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	
	145					150					155					160	
20																	
	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
					165					170					175		
25																	
	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	
				180					185					190			
30																	
	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
			195					200					205				
35																	
	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	
		210					215					220					
40																	
	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	
	225					230					235					240	
45																	
	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	
					245					250					255		
50																	
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
				260					265					270			
55																	
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
			275					280					285				
55																	
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
		290					295					300					
55																	
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	
	305					310					315					320	

UA 122673 C2

	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
					325					330					335		
5	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
				340					345					350			
10	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			355					360					365				
15	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
		370					375					380					
20	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
	385					390					395					400	
25	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
					405					410					415		
30	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
				420					425					430			
35	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
			435					440					445				
40	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
		450				455						460					
45	Pro	Gly	Lys														
	465																
50	<210>	29															
	<211>	15															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
55	<220>																
	<221>	Джерело інформації															
	<223>	/Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"															
60	<400>	29															
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
	1				5					10					15		
65	<210>	30															
	<211>	5															
	<212>	PRT															

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> Джерело інформації

5 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 30

10 Asp Lys Thr His Thr
1 5

<210> 31

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> Джерело інформації

20 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 31

25 Gly Tyr Val Leu Pro Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5 10

<210> 32

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> Джерело інформації

35 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 32

40 Val Thr Thr Pro Gly Gly Gly Thr Ile Asn
1 5 10

<210> 33

<211> 13

45 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> Джерело інформації

50 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 33

55 Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 34

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

10 <400> 34
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Pro Phe Met Asn
 1 5 10 15

15 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

20 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

25 <400> 35
 Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser
 1 5

30 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

35 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

40 <400> 36
 Gln Gln Ser Glu Glu Val Pro Leu Thr
 1 5

45 <210> 37
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

55 <400> 37
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Leu Pro Asn Tyr
20 25 30

5
Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

10
Gly Val Thr Thr Pro Gly Gly Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

15
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

20
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

25
Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
100 105 110

30
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

35
<210> 38
<211> 114
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

40
<220>
<221> Джерело інформації
<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

45
<400> 38
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

50
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

55
Gly Ile Pro Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

60
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

65
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

5 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu
 85 90 95
 Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 10 Thr Val
 15 <210> 39
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 20 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний
 поліпептид"
 25 <400> 39
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 30 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Leu Pro Asn Tyr
 20 25 30
 35 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Thr Thr Pro Gly Gly Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 40 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 45 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 50 Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
 100 105 110
 55 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

130 135 140

5 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

10 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

15 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

20 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

25 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr
225 230

30 <210> 40
<211> 690
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

35 <220>
<221> Джерело інформації
<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний
полінуклеотид"

40 <400> 40
caagtgcagc tgggtgcagtc aggggccgag gttaagaagc cagggagcag cgtcaaggta
60

tcttgtaaag cgtctggtta cgtccttcca aactacctga tcgaatgggt gaggcaggct
120

45 cccggccaag gcctggaatg gatgggagtt accaccctg ggggcggcac cattaattac
180

50 gccagaaat ttcagggacg agtgacgatt accgccgacg agtccaccag tactgcctac
240

atggagctgt cctcactccg cagcgaggac acggcagttt actactgcg cgggagtcga
300

55 tgggaccctc ttactatta tgctctggaa tactggggcc agggaacgac cgttacagtg
360

tcatttgcta gcacaaaagg accatcagtc ttcccacttg ctccttcac taagagcaca
420

```

    agtgggtggca ctgcagccct tggctgcctg gtgaaagatt atttccccga acctgttaca
    480

5   gtttcttggga actccggtgc actgacatcc ggagtacaca ctttcccagc tgtgctgcag
    540

    agctcaggac tgtatagcct gtcttcggtg gtcactgttc catcgtcgag tcttggcaca
    600

10  cagacatata tttgcaacgt caatcacaag ccctccaaca caaaagtgga taagaaggtc
    660

    gagcccaaatt cttgtgacaa aacacacaca
15  690

    <210> 41
    <211> 448
20  <212> PRT
    <213> Штучна послідовність

    <220>
    <221> Джерело інформації
25  <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

    <400> 41
    Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
    1          5          10          15

30  Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Leu Pro Asn Tyr
    20          25          30

35  Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
    35          40          45

40  Gly Val Thr Thr Pro Gly Gly Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50          55          60

    Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
45  65          70          75          80

    Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
50  85          90          95

    Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
    100          105          110

55  Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
    115          120          125

```

	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	
	130						135					140					
5	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
	145					150					155					160	
10	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
				165						170					175		
15	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
				180					185					190			
20	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	
			195					200					205				
25	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	
	210						215					220					
30	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	
	225					230					235					240	
35	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
					245					250					255		
40	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
				260					265					270			
45	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
			275					280					285				
50	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	
	290					295						300					
55	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
	305					310					315					320	
60	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
					325					330					335		
65	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
				340					345					350			
70	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	

UA 122673 C2

355 360 365
 5 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 385 390 395 400
 10 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 15 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 20 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 25 <210> 42
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 30 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"
 <400> 42
 35 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 40 Gly Ile Pro Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 45 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 50 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 55 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu
 85 90 95
 Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

UA 122673 C2

	100	105	110
5	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln 115	120	125
10	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr 130	135	140
15	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser 145	150	155
	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr 165	170	175
20	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys 180	185	190
25	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro 195	200	205
30	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210	215	
35	<210> 43 <211> 1344 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		
40	<220> <221> Джерело інформації <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний полінуклеотид"		
45	<400> 43 caagtgcagc tgggtgcagtc aggggccgag gttaagaagc caggagcag cgtcaaggta 60		
50	tcttgtaaag cgtctggtta cgtccttcca aactacctga tcgaatgggt gaggcaggct 120 cccggccaag gcctggaatg gatgggagtt accaccctg ggggcggcac cattaattac 180		
55	gccagaaat ttcagggacg agtgacgatt accgccgacg agtccaccag tactgcctac 240 atggagctgt cctcactccg cagcgaggac acggcagttt actactgcgc ccggagtcga 300		
	tgggaccctc ttactatta tgctctggaa tactggggcc aggaacgac cgttacagtg 360		

tcattctgcta gcaccaaggg cccatcgggc ttccccctgg cgccttgctc caggagcacc
420

5 tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
540

10 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc
600

cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt
15 660

gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca
720

20 gtcttctctt tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc
780

acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccagg tccagttcaa ctggtacgtg
840

25 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg
900

ttcgtgtgg tcagcgtcct caccgtcgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac
30 960

aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc
1020

35 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc
1080

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg
1140

40 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac
1200

tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag
45 1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcgagaag
1320

50 agcctctccc tgtctccggg taaa
1344

<210> 44
55 <211> 654
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний полінуклеотид"

5 <400> 44
 gacatagtga tgactcaaag tccggacagc ctggcggtgt cactcggcga acgggcaact
 60
 atcaactgcc gagccagcga gagcgtcgat aattacggca tccccttcat gaactggtat
 10 120
 cagcagaagc caggacagcc gcccaagctg cttatctacg ccgcttccaa ccggggatca
 180
 15 ggggtgcccg atcgatttag tggaagcggg agtgggaccg atttcacact gaccatcagc
 240
 tcccttcagg ccgaggatgt ggctgtctat tattgtcagc aatccgagga agtgccgctc
 300
 20 acgtttggtc agggaaccaa actggagatc aagcggaccg tagcggcgcc tagtgtcttc
 360
 atcttccac cctccgacga acagctgaag tctggcactg cttccgtcgt gtgcctgctc
 25 420
 aacaactttt accctagaga ggcaaaagtt caatggaaag tagacaatgc cttgcagtcc
 480
 30 gggaactccc aggagtctgt cacagagcag gatagtaagg actcaaccta cagcctgtcc
 540
 agcacactga ccctctccaa agccgactac gagaagcaca aagtgtacgc ttgcgaagtt
 600
 35 acgcatcagg ggctgtcctc acccgttaca aaaagtttta acagagggga gtgc
 654

40 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

45 <220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Будь-яка амінокислота, за винятком Ala

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)


```

<223> Будь-яка амінокислота, за винятком Ser

<400> 45
Gly Tyr Xaa Leu Xaa Asn Tyr Leu Ile Glu
5 1 5 10

<210> 46
<211> 10
10 <212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> Джерело інформації
15 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Будь-яка амінокислота, за винятком Ile

<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Будь-яка амінокислота, за винятком Ser

<400> 46
30 Val Xaa Thr Pro Gly Xaa Gly Thr Ile Asn
1 5 10

<210> 47
35 <211> 448
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
40 <221> Джерело інформації
<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 47
45 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Leu Pro Asn Tyr
20 25 30

50 Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

55 Gly Val Thr Thr Pro Gly Gly Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

```

	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
5	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
10	Ala	Arg	Ser	Arg	Trp	Asp	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Glu	Tyr	Trp	100	105	110	
15	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	115	120	125	
20	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	130	135	140	
25	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155	160
30	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175	
35	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	180	185	190	
40	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	195	200	205	
45	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	210	215	220	
50	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	225	230	235	240
55	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255	
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	260	265	270	
	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	275	280	285	
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val				

UA 122673 C2

	290		295		300
5	Ser Val Leu Thr Val Val Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	305	310	315	320
10	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		325	330	335
15	Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		340	345	350
20	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		355	360	365
25	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		370	375	380
30	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp		385	390	395
35	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		405	410	415
40	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		420	425	430
45	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		435	440	445
50	<210> 48 <211> 1344 <212> ДНК <213> Штучна послідовність				
55	<220> <221> Джерело інформації <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний полінуклеотид"				
60	<400> 48 caagtgcagc tgggtgcagtc aggggccgag gttaagaagc caggagcag cgtcaaggta				
65	tcttgtaaag cgtctgggta cgtccttcca aactacctga tcgaatgggt gaggcaggct				
70	cccggccaag gcctggaatg gatgggagtt accaccctg ggggcggcac cattaattac				
75	180				

gccagaaat ttcagggacg agtgacgatt accgccgacg agtccaccag tactgcctac
 240
 5 atggagctgt cctcactccg cagcgaggac acggcagttt actactgcg cccgagtcga
 300
 tgggaccctc ttactatta tgctctggaa tactggggcc aggaacgac cgttacagtg
 360
 10 tcattctgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgcctgctc caggagcacc
 420
 tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
 15 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgcctacag
 540
 20 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc
 600
 cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt
 660
 25 gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca
 720
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc
 30 780
 acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg
 840
 35 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg
 900
 ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcgtg gcccaggact ggctgaacgg caaggagtac
 960
 40 aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc
 1020
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc
 1080
 45 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg
 1140
 50 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac
 1200
 tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag
 1260
 55 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag
 1320

agcctctccc tgtctccggg taaa
1344

5 <210> 49
<211> 19
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<221> Джерело інформації
<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

15 <400> 49
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

20 Ala His Ser

<210> 50
25 <211> 227
<212> PRT
<213> Хомо сапієнс

<400> 50
30 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
35 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
40 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

45 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

50 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

55 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

UA 122673 C2

	115		120		125
5	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	130	135	140	
10	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	145	150	155	160
15	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	165	170	175	
20	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	180	185	190	
25	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	195	200	205	
30	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	210	215	220	
35	Pro Gly Lys	225			
40	<210> 51				
	<211> 223				
	<212> PRT				
	<213> Хомо сапієнс				
45	<400> 51				
	Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val	1	5	10	15
50	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	20	25	30	
55	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	35	40	45	
60	Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	50	55	60	
65	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser	65	70	75	80
70	Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys				

UA 122673 C2

				85					90					95			
5	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
				100					105					110			
10	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
			115					120					125				
15	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
		130					135					140					
20	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
	145					150					155					160	
25	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	
					165					170					175		
30	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
			180						185					190			
35	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
		195						200					205				
40	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
		210					215					220					
45	<210> 52 <211> 251 <212> PRT <213> Штучна послідовність																
50	<220> <221> Джерело інформації <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"																
55	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
	1				5					10				15			
60	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Val	Leu	Pro	Asn	Tyr	
				20					25					30			
65	Leu	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40						45				
70	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Gly	Gly	Gly	Thr	Ile	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	

UA 122673 C2

	50		55		60
5	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	65	70	75	80
10	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95	
15	Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp	100	105	110	
20	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly	115	120	125	
25	Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys	145	150	155	160
30	Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Pro Phe Met Asn Trp	165	170	175	
35	Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala	180	185	190	
40	Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser	195	200	205	
45	Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val	210	215	220	
50	Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly	225	230	235	240
55	Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val	245	250		
	<210> 53				
	<211> 251				
	<212> PRT				
	<213> Штучна послідовність				
	<220>				
	<221> Джерело інформації				

<223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 53

5	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	1	5	10	15
10	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	20	25	30	
15	Gly	Ile	Pro	Phe	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	35	40	45	
20	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Arg	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	50	55	60	
25	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	65	70	75	80
30	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Glu	85	90	95	
35	Glu	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	100	105	110	
40	Thr	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	115	120	125	
45	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	130	135	140	
50	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Val	Leu	Pro	Asn	145	150	155	160
55	Tyr	Leu	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	165	170	175	
	Met	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Gly	Gly	Gly	Thr	Ile	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	180	185	190	
	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	195	200	205	
	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	210	215	220	

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr
 225 230 235 240

5

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 245 250

10

<210> 54
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

15

<220>
 <221> Джерело інформації
 <223> /Примітка="Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 54

20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

25

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Leu Pro Asn Tyr
 20 25 30

30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

35

Gly Val Thr Thr Pro Gly Gly Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

40

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

45

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

50

Ala Arg Ser Arg Trp Asp Pro Leu Tyr Tyr Tyr Ala Leu Glu Tyr Trp
 100 105 110

55

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
					165					170					175	
5	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
				180					185					190		
10	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp
			195					200					205			
15	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	
		210					215					220				

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, що специфічно зв'язується з людським IL-6, яке містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 37, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 38.
2. Виділене антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, що специфічно зв'язується з людським IL-6, яке містить послідовність важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 41, та послідовність легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 42.
3. Виділений Fab, що специфічно зв'язується з людським IL-6, який містить послідовність важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 39 або SEQ ID NO: 54, і послідовність легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 42.
4. Антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, за будь-яким з попередніх пунктів формули, яке **відрізняється** тим, що містить мутацію (наприклад, 1, 2, 3 або 4 мутації) в одному чи декількох положеннях, що відповідають H311, D313, I254 або H436 (нумерація як у SEQ ID NO: 41).
5. Антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, за п. 4, яке **відрізняється** тим, що зазначену мутацію вибирають з однієї чи декількох з H311A, H311E, H311N, D313T, I254A, I254R та H436A (нумерація як у SEQ ID NO: 41).
6. Антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, за будь-яким з попередніх пунктів формули, яке **відрізняється** тим, що містить мутацію H311A (нумерація як у SEQ ID NO: 41).
7. Антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, за будь-яким з пп. 4-6, яке **відрізняється** тим, що зазначена мутація зменшує системне накопичення антитіла або антигензв'язуючого фрагмента порівняно із системним накопиченням антитіла або антигензв'язуючого фрагмента, що не містить мутації.
8. Антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, за будь-яким з пп. 4-6, яке **відрізняється** тим, що зазначена мутація зменшує системне накопичення антитіла або антигензв'язуючого фрагмента порівняно із системним накопиченням антитіла або антигензв'язуючого фрагмента, що не містить мутації, причому системне накопичення оцінюють після інтравітреального введення антитіла або антигензв'язуючого фрагмента.
9. Антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, є ізоформою IgG2-A або ізоформою IgG2-A/B, але не ізоформою IgG2-B.
10. Виділене антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, що специфічно зв'язується з людським IL-6, яке містить послідовність важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 47 та послідовність легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 42.
11. Антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, за будь-яким з попередніх пунктів, для застосування у лікуванні суб'єкта (наприклад, людини) з очною хворобою, яка характеризується підвищеним рівнем IL-6.
12. Антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, за п. 11, яке **відрізняється** тим, що зазначена хвороба є очною хворобою, яка характеризується підвищеним рівнем IL-6 у склистому тілі.
13. Антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, за п. 11 або 12 для застосування у лікуванні суб'єкта (наприклад, людини) з діабетичним макулярним набряком (ДМН), діабетичною ретинопатією, увеїтом, сухими очами (наприклад, хворобою сухих очей або сухим кератокон'юнктивітом), алергічним кон'юнктивітом, віковою макулярною дегенерацією (ВМД), проліферативною діабетичною ретинопатією (ПДР), регматогенним відшаруванням сітківки

(РВС), оклюзіями вен сітківки (ОВС), нейромієлітом зорового нерва (НЗН), пересадженням рогівки, подряпиною рогівки або фізичним ушкодженням ока.

14. Антитіло, або антигензв'язуючий фрагмент, за п. 13 для застосування у лікуванні суб'єкта (наприклад, людини) з ДМН.

5 15. Композиція для застосування у лікуванні очної хвороби, яка характеризується підвищеним рівнем ІЛ-6, яка містить антитіло або антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-14 та, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій.

10 16. Композиція за п. 15 для застосування у лікуванні діабетичного макулярного набряку (ДМН), діабетичної ретинопатії, сухих очей (наприклад, хвороби сухих очей або сухого кератокон'юнктивіту), алергічного кон'юнктивіту, увеїту, вікової макулярної дегенерації (ВМД), проліферативної діабетичної ретинопатії (ПДР), регматогенного відшарування сітківки (РВС), оклюзії вен сітківки (ОВС), нейромієліту зорового нерва (НЗН), пересадження рогівки, подряпини рогівки або фізичного ушкодження ока.

15 17. Застосування терапевтично ефективної кількості антитіла ІЛ-6 або антигензв'язуючого фрагмента за будь-яким з пп. 1-14 або композиції за будь-яким з пп. 15 або 16 у виготовленні лікарського засобу для лікування хвороби, асоційованої з ІЛ-6, де хвороба, асоційована з ІЛ-6, є очною хворобою, яка характеризується підвищеним рівнем ІЛ-6 у склистому тілі.

20 18. Застосування за п. 17, яке **відрізняється** тим, що хвороба, асоційована з ІЛ-6, є діабетичним макулярним набряком (ДМН), діабетичною ретинопатією, увеїтом, сухими очима (наприклад, хворобою сухих очей або сухим кератокон'юнктивітом), алергічним кон'юнктивітом, віковою макулярною дегенерацією (ВМД), проліферативною діабетичною ретинопатією (ПДР), регматогенним відшаруванням сітківки (РВС), оклюзіями вен сітківки (ОВС), нейромієлітом зорового нерва (НЗН), пересадженням рогівки, подряпиною рогівки або фізичним ушкодженням ока.

25 19. Застосування за п. 17, яке **відрізняється** тим, що антитіло або антигензв'язуючий фрагмент доставляють у склисте тіло ока суб'єкта.

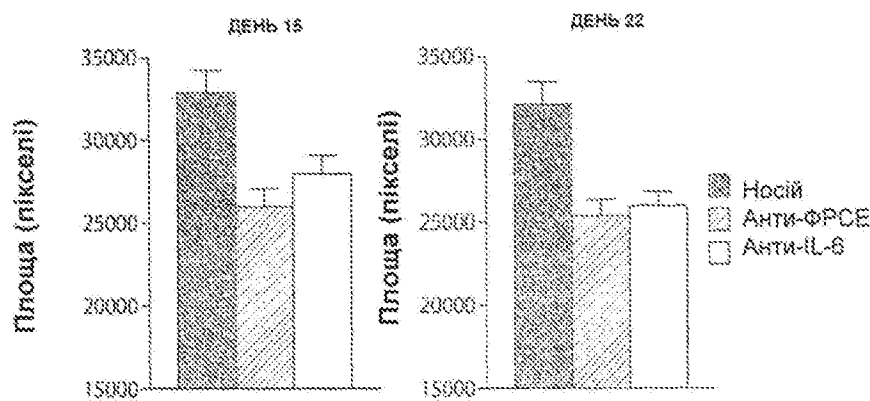
20 20. Застосування за будь-яким з пп. 17-19, яке **відрізняється** тим, що хвороба, асоційована з ІЛ-6, є діабетичним макулярним набряком, і антитіло або його фрагмент доставляють у склисте тіло ока суб'єкта.

30 21. Нуклеїнова кислота, яка включає послідовність, що кодує антитіло або антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-14.

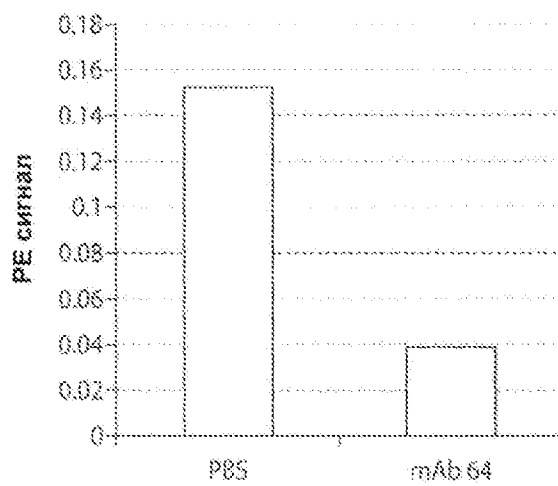
22. Нуклеїнова кислота, яка включає SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 43 або SEQ ID NO: 48.

23. Вектор, який включає нуклеїнову кислоту за п. 21 або 22.

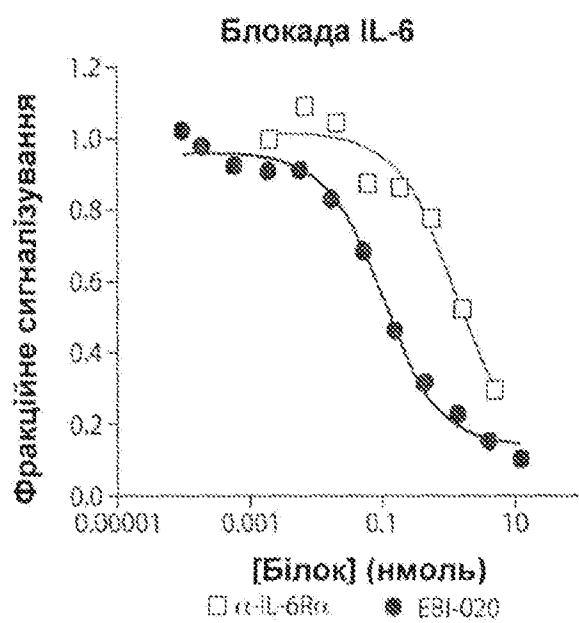
24. Клітина, яка включає вектор за п. 23.



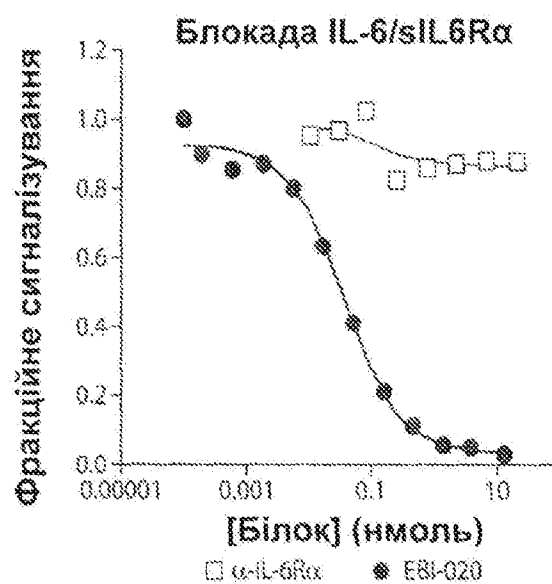
ФІГ. 1



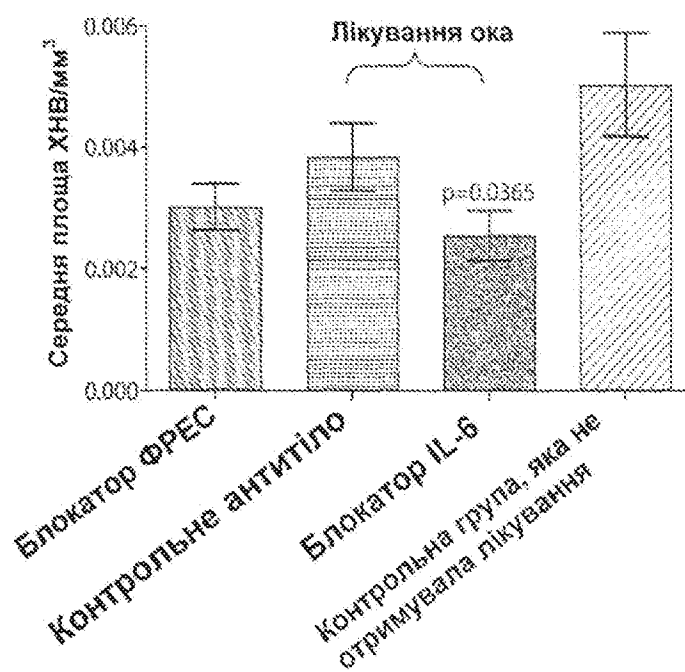
ФІГ. 2



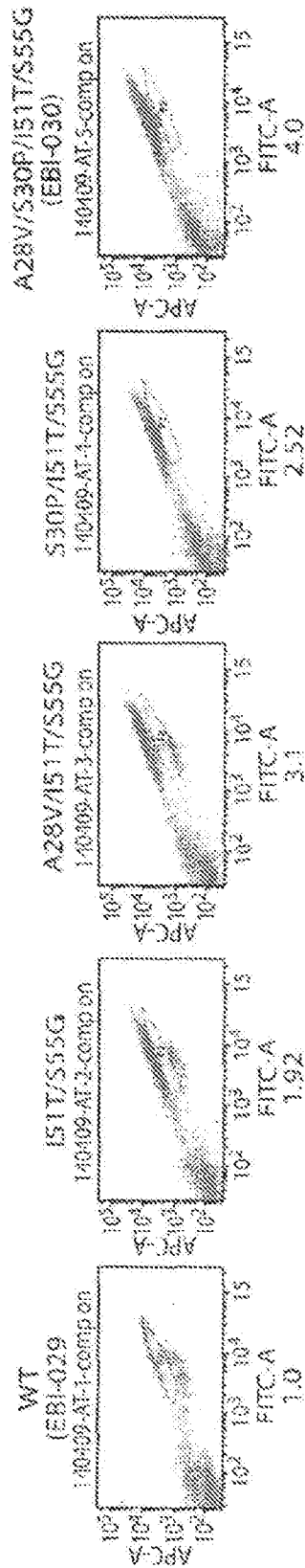
ФІГ. 3А



ФІГ. 3В

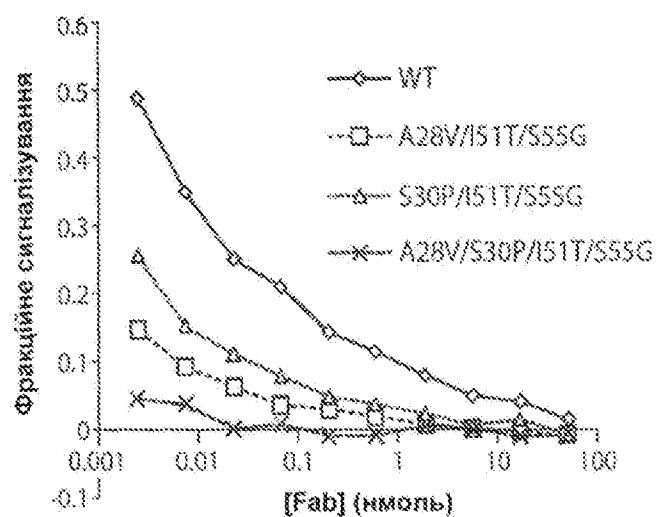


ФІГ. 4

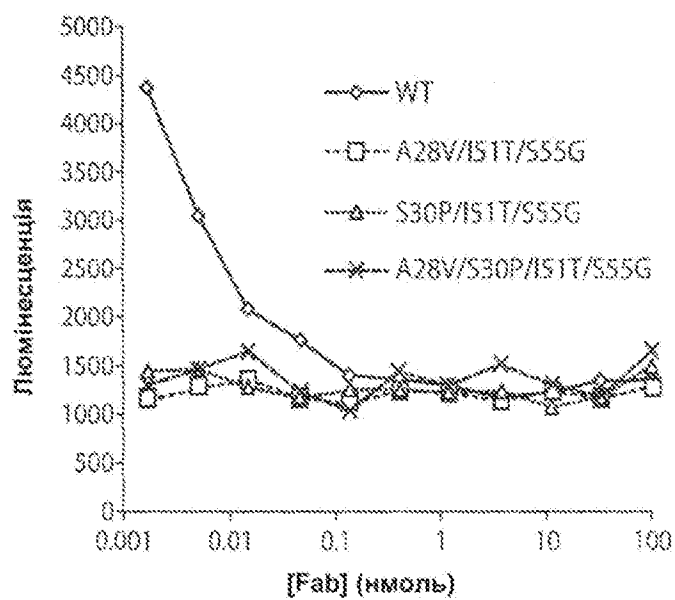


Кратне збільшення
прив'язки/показано
по мас.

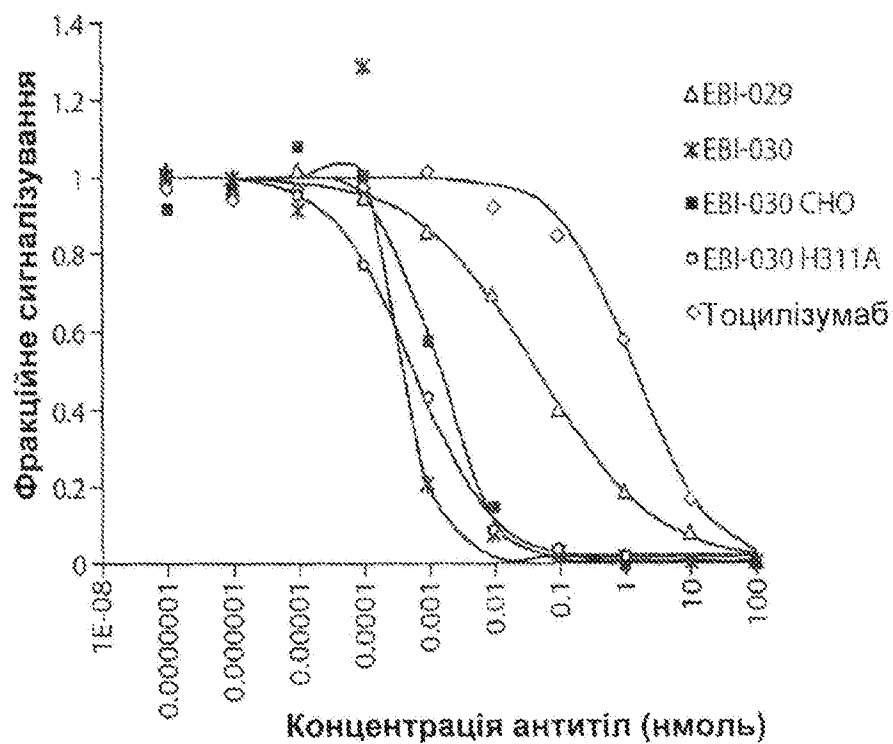
ФІГ. 5



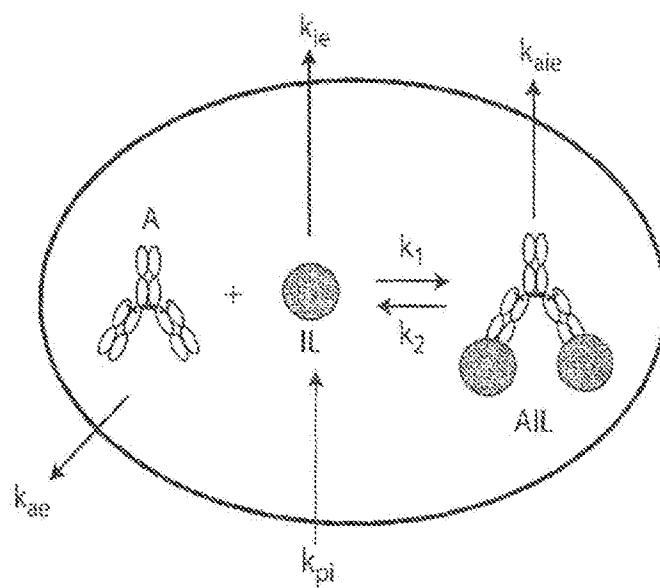
ФІГ. 6



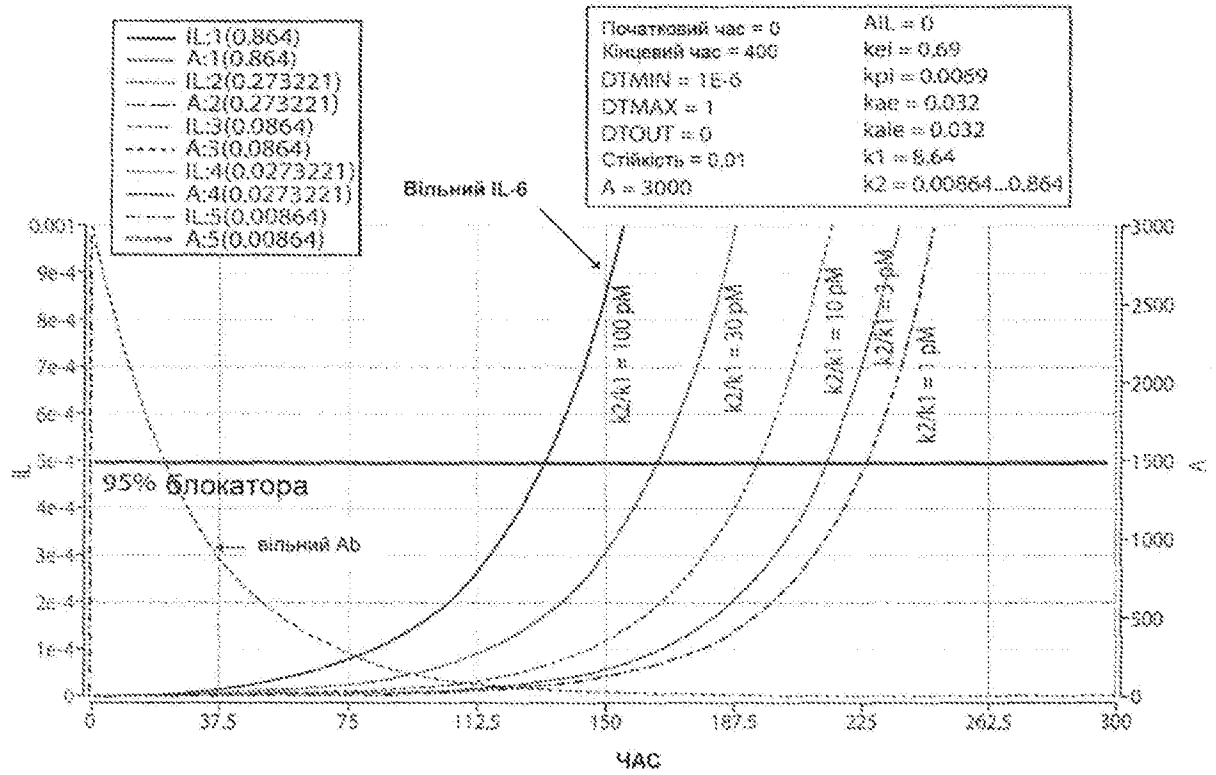
ФІГ. 7



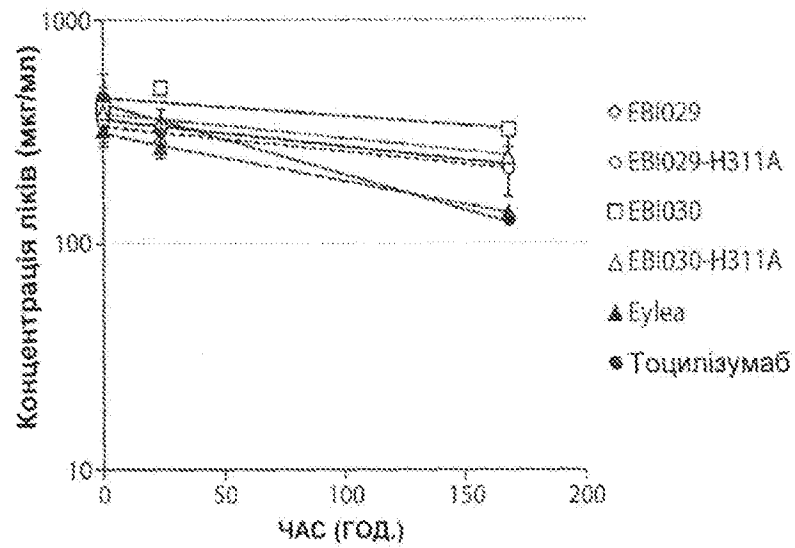
ФІГ. 8



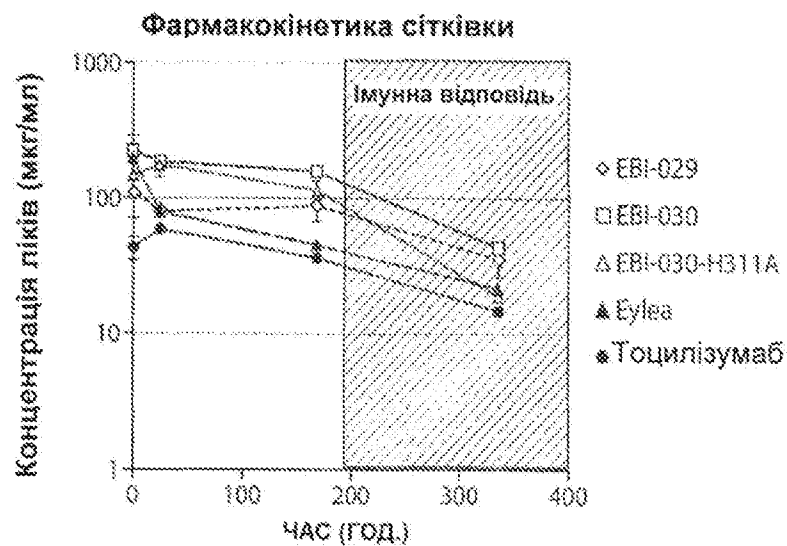
ФІГ. 9



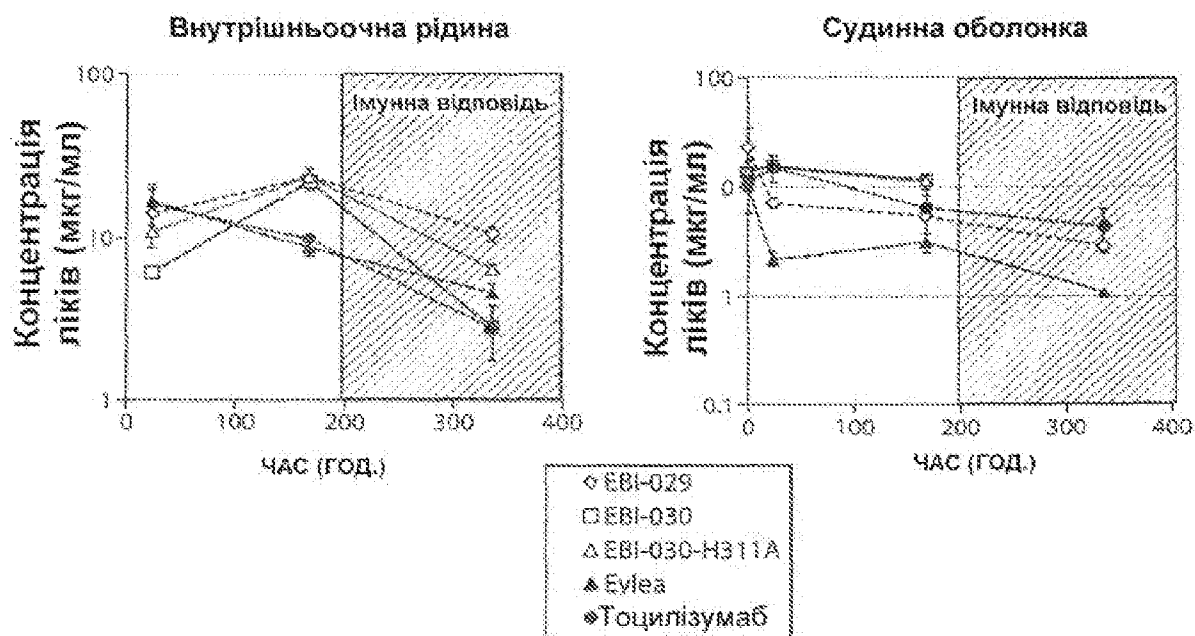
ФІГ. 10



ФІГ. 11

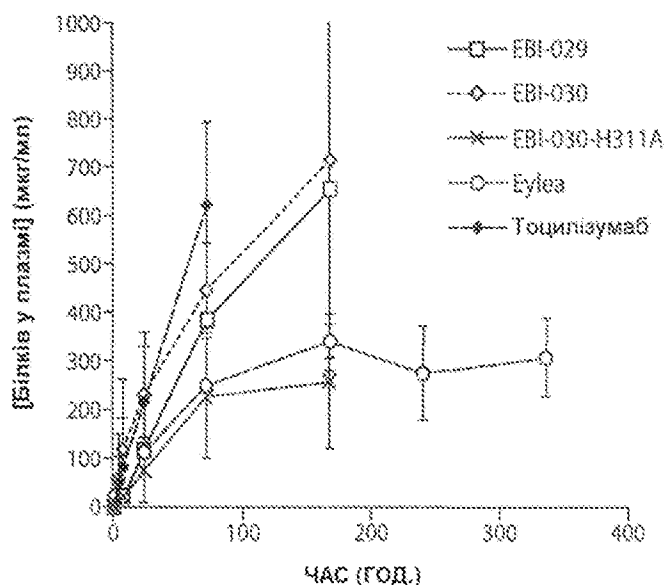


ФІГ. 12

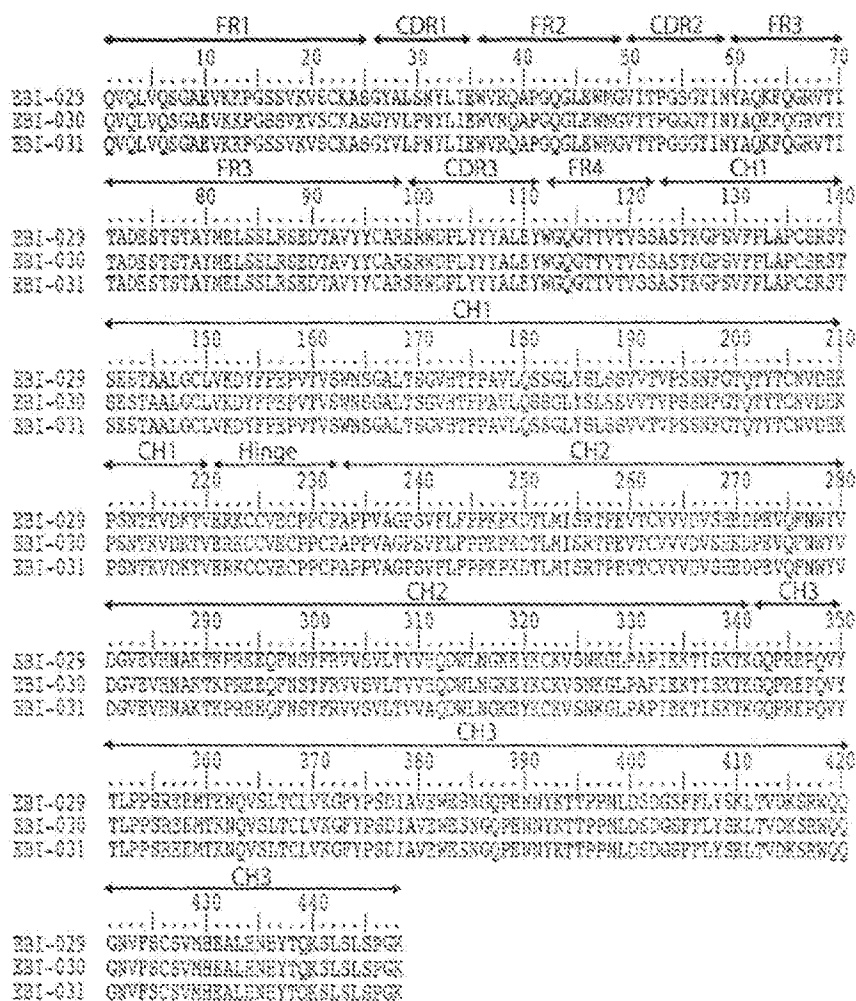


ФІГ. 13

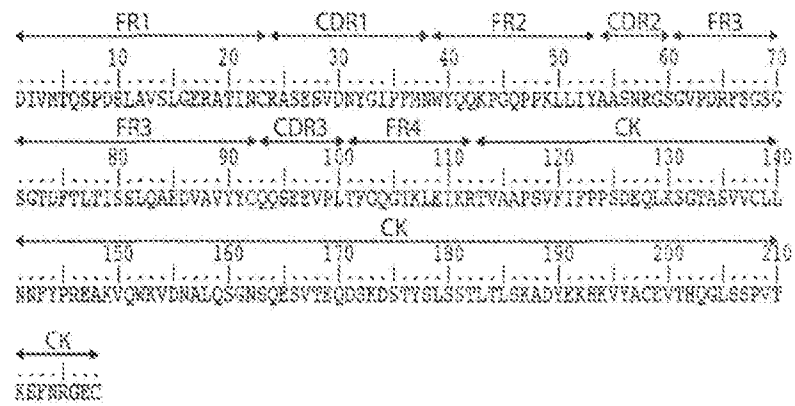
Системне накопичення після введення IBT



ФІГ. 14

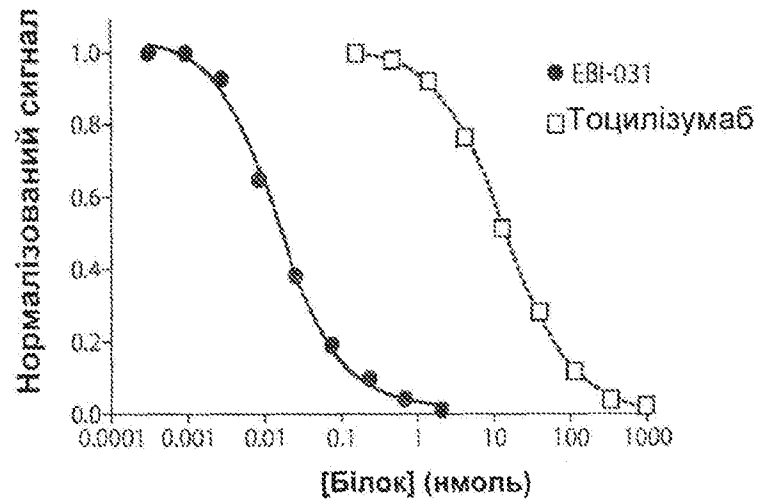


ФІГ. 15A



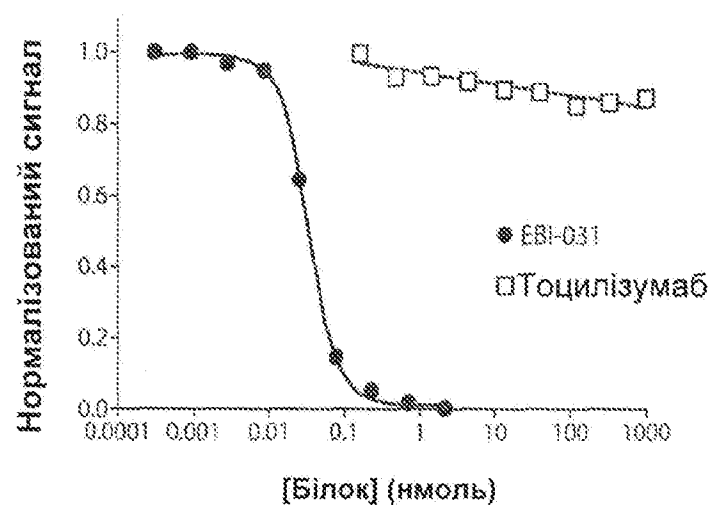
ФІГ. 15В

Cis-сигналізування (Людський IL-6)

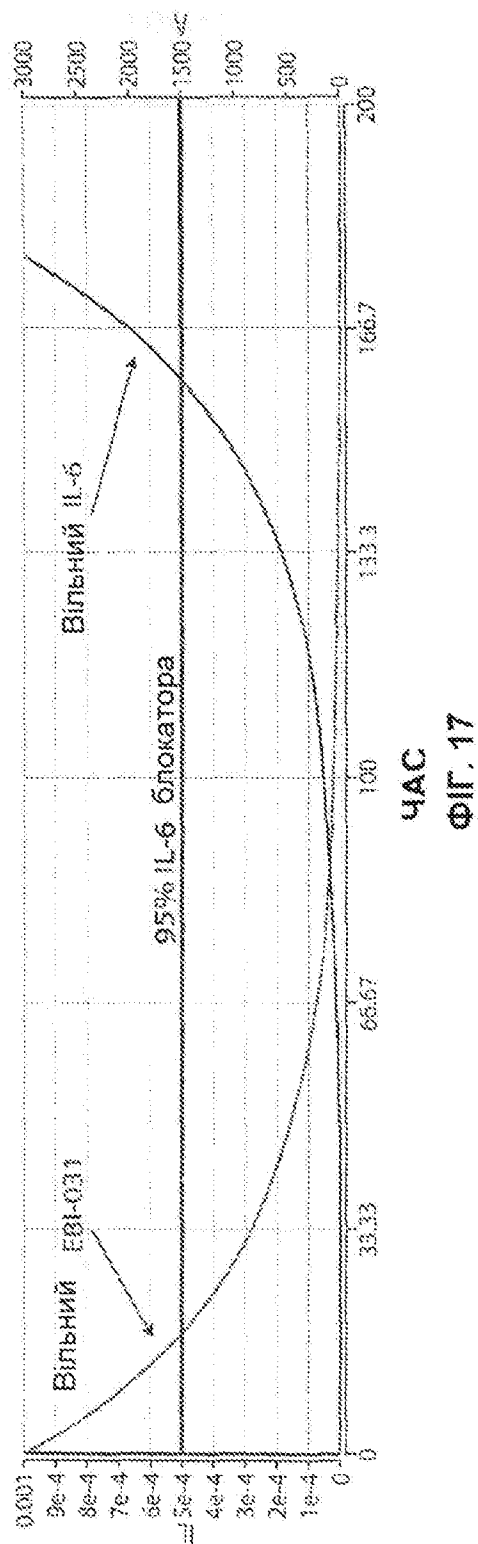


ФІГ. 16А

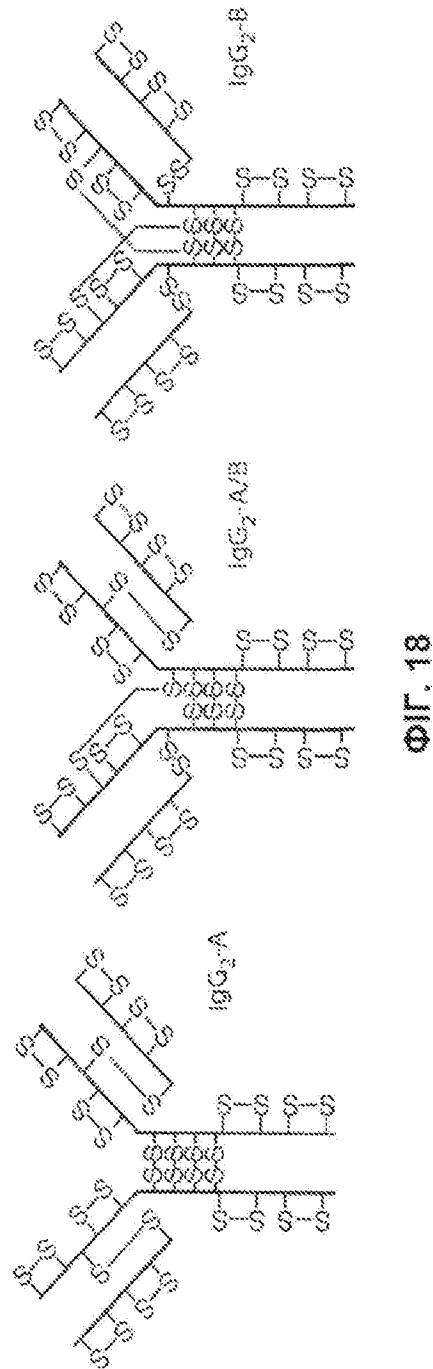
Транс-сигналізування (Людський IL-6)



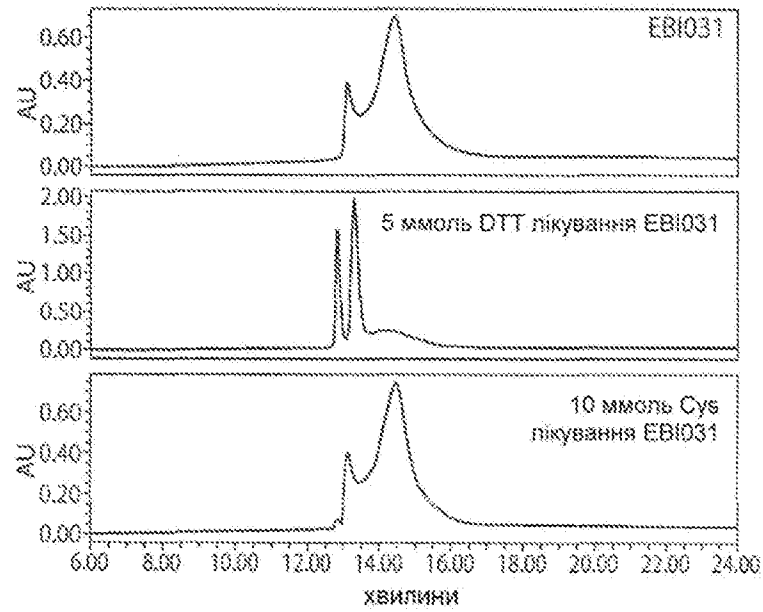
ФІГ. 16В



ЧАС
ФІГ. 17

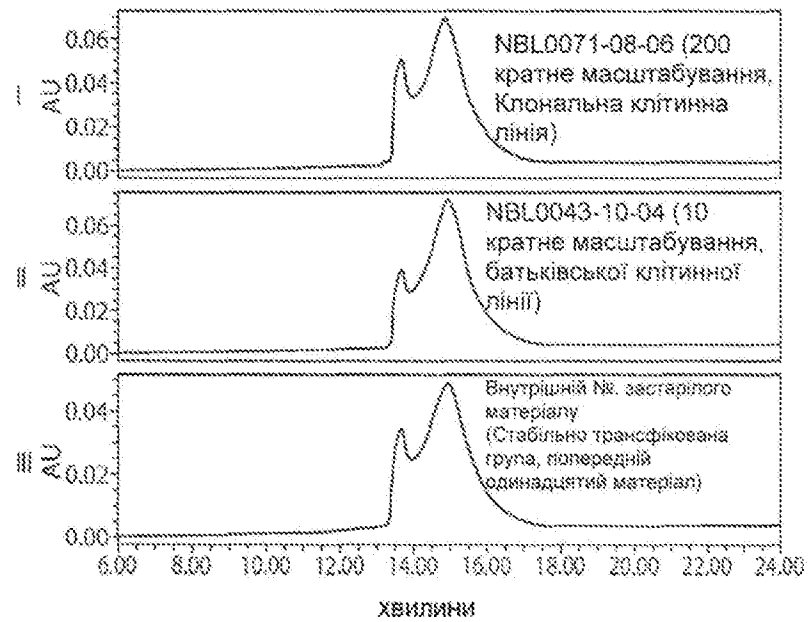


Фиг. 18



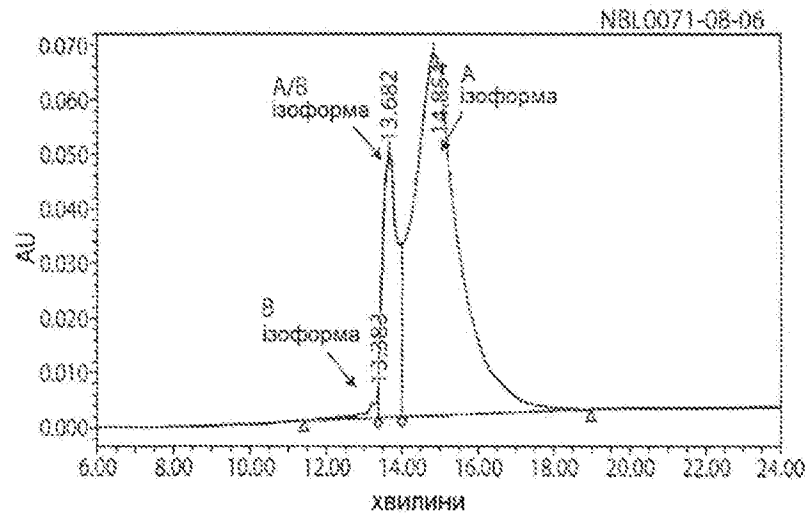
ФІГ. 19

**Дисульфідний зв'язок ізоформи ОФ-ВЕРХ -
порівняння EBI-031 зразків**



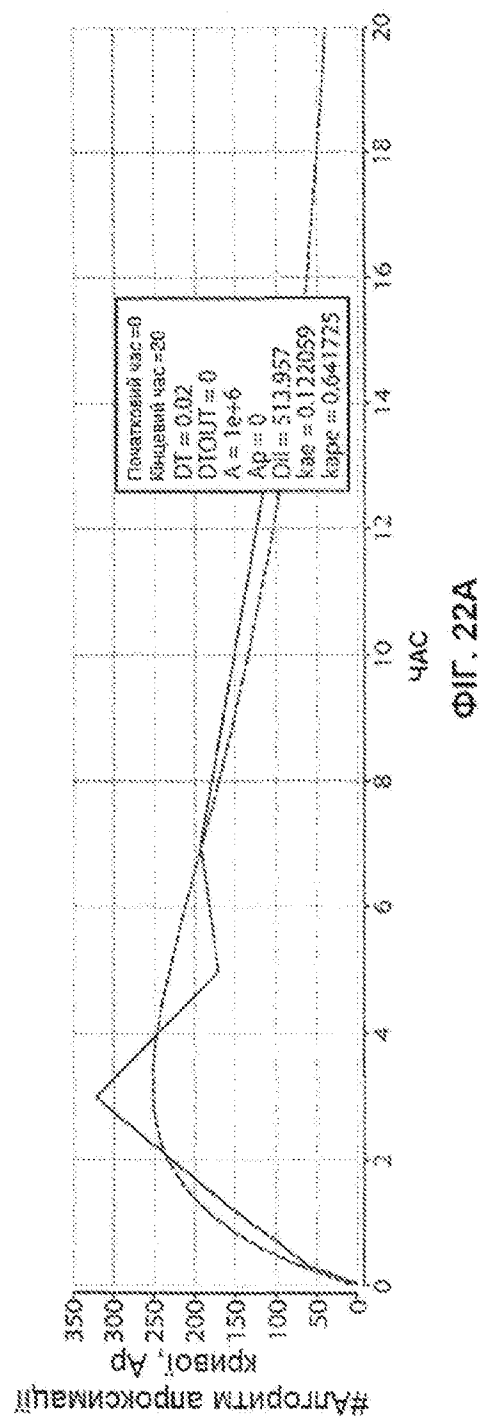
ФІГ. 20

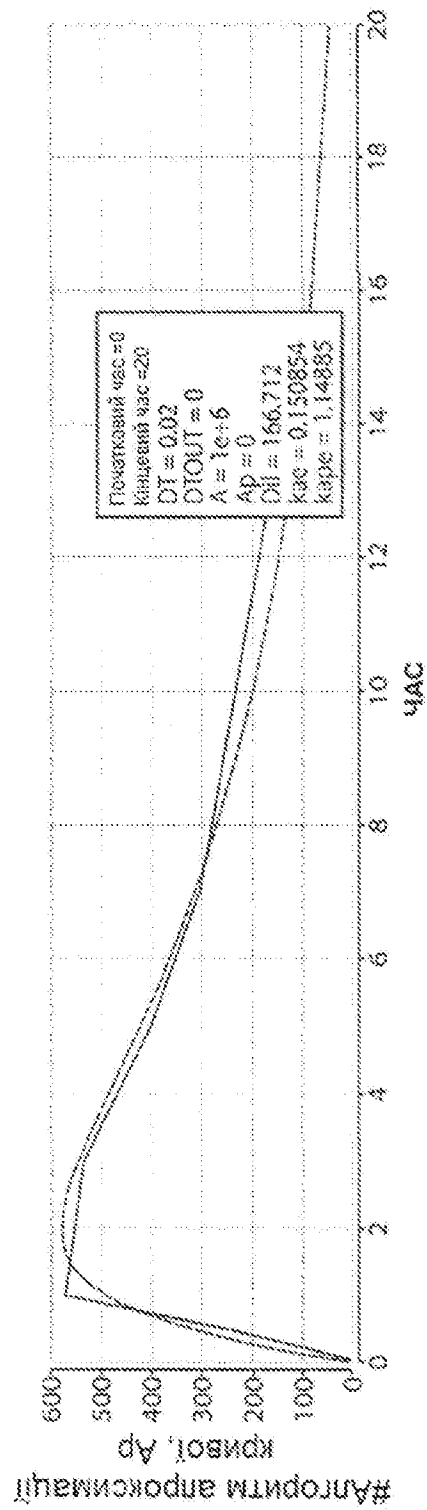
**EBI-031 (NBL0071-08-06, БМН від 200 кратного
масштабування біореактором, клональна клітинна
лінія) дисульфідний зв'язок ізоформи ОФ-ВЕРХ**



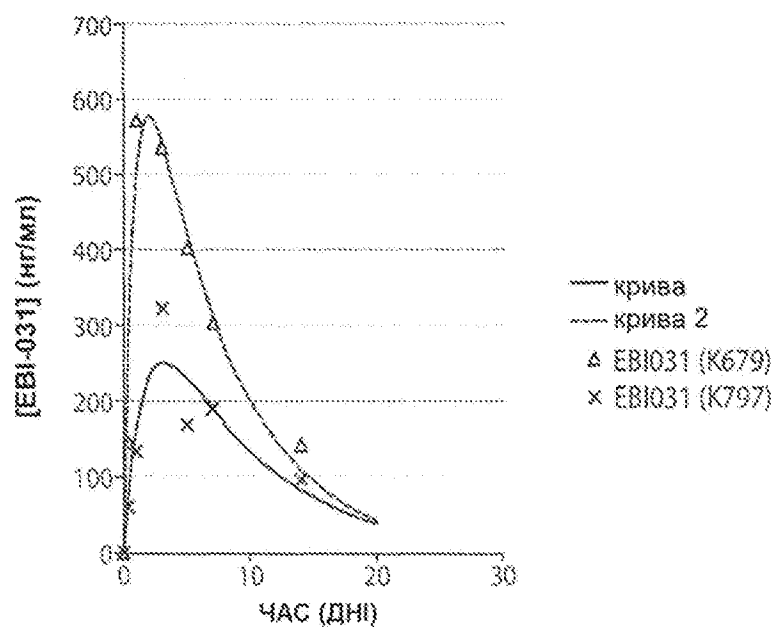
НАЗВА	ЧР	ОБЛАСТЬ	%ОБЛАСТІ
В ізоформа	13.383	58509	0.85
А/В ізоформа	13.682	1349980	19.67
А ізоформа	14.854	5453505	79.47

ФІГ. 21

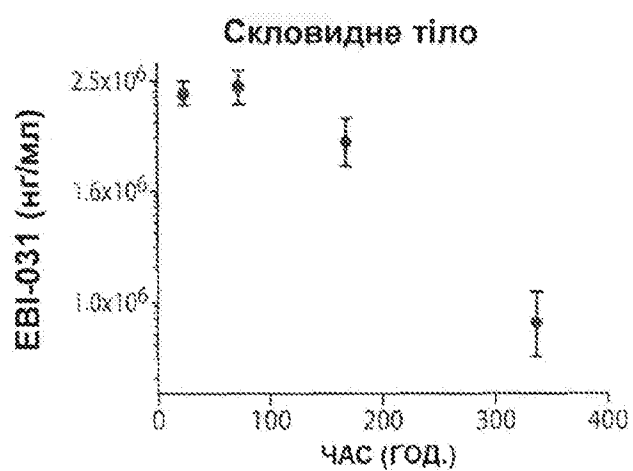




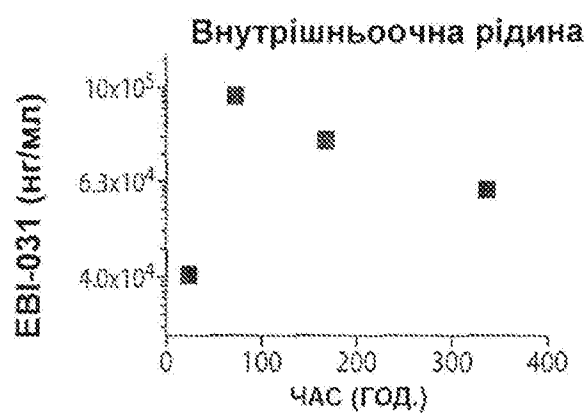
ФІГ. 22В



ФІГ. 23



ФІГ. 24А



ФІГ. 24В

