



УКРАЇНА

(19) **UA**
(51) МПК(11) **129242**(13) **C2****A61K 47/68** (2017.01)**A61K 47/36** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 27/02** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2019 09814	(73) Володілець (володільці):	ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990, United States of America (US)
(22) Дата подання заявки:	22.03.2018	(74) Представник:	Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	27.02.2025	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2011/066417 A2, 03.06.2011 Biological activities of cytokine-neutralizing hyaluronic acid-antibody conjugates / Sun L. T. et al. / Wound repair and regeneration. 15.05.2010. Vol. 18. No. 3. P. 302 – 310 URL: http://doi:10.1111/j.1524-475X.2010.00591.x (дата звернення 16.11.2023) Multivalent hyaluronic acid bioconjugates improve sFlt-1 activity in vitro / Altioek E. I. et al. / Biomaterials. 01.07.2016. Vol. 93. P. 95 – 105 URL: http://doi:10.1016/j.biomaterials.2016.03.017 (дата звернення 16.11.2023) WO 2005/044853 A2, 1.05.2005 WO 2017/053807 A2, 30.03.2017 WO 02/092131 A2, 21.11.2002 sFlt Multivalent Conjugates Inhibit Angiogenesis and Improve Half-Life In Vivo / Altioek E. I. et al. / PLOS ONE. 03.06.2016. Vol. 11. No. 6. P. e0155990 URL: http://doi:10.1371/journal.pone.0155990 (дата звернення 16.11.2023) Anti-Fit1 peptide Hyaluronate conjugate for the treatment of retinal neovascularization and diabetic retinopathy / Oh E. J. et al. / Biomaterials. Vol. 32. No. 11. 04.01.2011. P. 3115 – 3123 URL: http://doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.01.003 (дата звернення 16.11.2023)
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/475,163		
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	22.03.2017		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.02.2020, Бюл.№ 4		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	26.02.2025, Бюл.№ 9		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2018/023812, 22.03.2018		
(72) Винахідник(и): Фамілі Амін (US), Фух Жермейн (US), Коеніг Патрік (US), Лі Чінгвей Вівіан (US), Раджагопал Картікан (US)			

(54) ОПТИМІЗОВАНА КОМПОЗИЦІЯ АНТИТІЛА ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ОЧЕЙ**(57) Реферат:**

Винахід стосується кон'югата антитіла, яке специфічно зв'язується з ФРЕС, та полімеру гіалуронової кислоти (ГК), де полімер ГК має індекс полідисперсності (PDI - polydispersity index) 1,1 або нижче та молекулярну масу близько 1 мегадальтона (MDa) або нижче, де антитіло

UA 129242 C2

специфічно зв'язується з ФРЕС, фармацевтичні композиції, і їх застосування, для лікування захворювань очей, пов'язаних з патологічним ангиогенезом.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

У цій заявці міститься перелік послідовностей, який був представлений в електронному вигляді у форматі ASCII і повністю включений в цей документ шляхом посилання. Зазначена копія ASCII, яка створена 22 березня 2018 року, називається 50474-160WO3_Sequence_Listing_3.22.18_ST25, і має розмір 57671 байт.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Винахід в цілому відноситься до кон'югатів антитіл, антитіл, сконструйованих за допомогою введення цистеїну (cysteine engineered), їх композиціям (наприклад, фармацевтичним композиціям), і способам їх застосування.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Ангіогенез являє собою строго регульований процес, за допомогою якого з раніше існуючих кровоносних судин утворюються нові кровоносні судини. Хоча ангіогенез має важливе значення в процесі розвитку для забезпечення адекватної циркуляції крові, численні порушення пов'язані з патологічним ангіогенезом, такими як захворювання очей (наприклад, вікова макулярна дегенерація, ВМД) і клітинні проліферативні захворювання (наприклад, рак). Фактор росту ендотелію судин (ФРЕС - VEGF-vascular endothelial growth factor) є клінічно апробованим стимулюючим фактором ангіогенезу, і нейтралізація ФРЕС (наприклад, з використанням блокуючого анти-ФРЕС антитіла), може бути використана для лікування порушень, пов'язаних з патологічним ангіогенезом.

Сучасні підходи до лікування захворювань очей, пов'язаних з патологічним ангіогенезом (наприклад, ВМД (AMD) (наприклад, волога ВМД), діабетичним макулярним набряком (ДМН), діабетичною ретинопатією (ДР) і оклюзією вени сітківки (ОВС)), як правило, включають ін'єкції в склоподібне тіло антагоністів ФРЕС (наприклад, анти-ФРЕС Fab ранібізумабу). Оскільки місце дії анти-ФРЕС Fab-фрагментів знаходиться на задній стінці ока на сітківці, а також тому, що Fab-фрагменти можуть мати відносно короткий час перебування в оці, максимальну користь для пацієнта від анти-ФРЕС Fab-фрагментів, як правило, одержують шляхом відносно частого введення доз (наприклад, кожні чотири тижні, Q4W) шляхом ін'єкції в склоподібне тіло. Пролонгована доставка анти-ФРЕС антитіл або фрагментів антитіл (наприклад, Fab-фрагментів) при захворюваннях очей може бути бажана щонайменше частково, щоб зменшити частоту введення доз, що може поліпшити зручність для пацієнта і дотримання режиму лікування.

У цьому випадку зберігається потреба в композиціях антитіл для пролонгованої доставки для лікування захворювань очей (наприклад, ВМД (наприклад, вологої ВМД), діабетичного макулярного набряку (ДМН), діабетичної ретинопатії (ДР) та оклюзії вени сітківки (ОВС)).

СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

Винахід забезпечує кон'югати антитіл, які містять монодисперсні полімери (наприклад, монодисперсні полімери гіалуронової кислоти (ГК)), ковалентно зв'язані з антитілами (наприклад, анти-ФРЕС антитілами), антитіла, сконструйовані введенням цистеїну, які можуть бути використані, наприклад, під час отримання кон'югатів антитіл, композицій, які містять кон'югати антитіл (наприклад, фармацевтичні композиції), а також способи їх отримання і застосування, наприклад, застосування в терапевтичних цілях.

В одному аспекті цей винахід відноситься до кон'югату антитіла, що містить (i) антитіло, і (ii) полімер гіалуронової кислоти (ГК), ковалентно приєднаний до антитіла, причому полімер ГК має індекс полідисперсності (PDI-polydispersity index) 1,1 або нижче. У деяких варіантах здійснення полімер ГК має PDI від 1,0 до 1,1. У деяких варіантах здійснення полімер ГК має PDI від 1,0 до близько 1,05. У деяких варіантах здійснення полімер ГК має PDI від близько 1,0001 до близько 1,05. У деяких варіантах здійснення полімер ГК має PDI близько 1,001. У деяких варіантах здійснення полімер ГК має молекулярну масу близько 1 мегадальтона (МДа) або нижче. У деяких варіантах здійснення полімер ГК має молекулярну масу від близько 25 кДа до близько 500 кДа. У деяких варіантах здійснення полімер ГК має молекулярну масу від близько 100 кДа до близько 250 кДа. У деяких варіантах здійснення полімер ГК має молекулярну масу від близько 150 кДа до близько 200 кДа. У деяких варіантах здійснення полімер ГК являє собою лінійний полімер ГК. У деяких варіантах здійснення кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус від близько 10 нм до близько 60 нм. У деяких варіантах здійснення кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус від близько 25 нм до близько 35 нм. У деяких варіантах здійснення гідродинамічний радіус становить від близько 20 нм до близько 30 нм.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом кон'югат антитіла має період напіввиведення з ока, який збільшується в порівнянні з еталонним антитілом, яке не приєднане ковалентно до полімеру ГК. У деяких варіантах здійснення період напіввиведення з ока збільшується щонайменше в близько 2 рази по відношенню до еталонного антитіла. У деяких

варіантах здійснення період напіввиведення з ока збільшується щонайменше в близько 4 рази по відношенню до еталонного антитіла. У деяких варіантах здійснення період напіввиведення з ока являє собою період виведення із склоподібного тіла. У деяких варіантах здійснення еталонне антитіло є ідентичним антитілу кон'югату антитіла.

5 У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло специфічно зв'язується з біологічною молекулою, вибраною з групи, що складається з фактора росту ендотелію судин (ФРЕС); ІЛ-1 β ; ІЛ-6; ІЛ-6R; ІЛ-13; ІЛ-13R; ТцФР (тромбоцитарного фактора росту); ангіопоетину; ангіопоетину-2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\text{v}\beta 3$, $\alpha\text{v}\beta 5$ і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора D комплементу; ФНП- α ; HTRA1; рецептора ФРЕС; ST-2-рецептора; і
10 білка, генетично пов'язаного з ризиком ВМД. У деяких варіантах здійснення рецептор ФРЕС являє собою ФРЕСР1, ФРЕСР2, ФРЕСР3, мзФРЕСР або рФРЕСР. У деяких варіантах здійснення білок, генетично пов'язаний з ризиком ВМД, вибирають із групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора В, фактора Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; ІЛ-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; і TNFRSF10A.

15 У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло специфічно зв'язується з ФРЕС. У деяких варіантах здійснення антитіло містить наступні шість гіперваріабельних ділянок (HVR): (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GX₁TPX₂GGX₃X₄YX₆DSVX₇X₈ (SEQ ID NO: 2), де X₁ являє собою Ile або His, X₂ являє собою Ala або Arg, X₃ являє собою Tyr або Lys, X₄ являє собою Thr або Glu, X₅ являє собою Arg, Tyr, Gln, або Glu, X₆ являє собою Ala або Glu, X₇ являє собою Lys або Glu, і X₈ являє собою Gly або Glu; (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQX₁VSTAVA (SEQ ID NO: 4), де X₁ являє собою Asp або Arg; (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність X₁ASFLYS (SEQ ID NO: 5), де X₁ являє собою Ser або Met; і
20 (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність X₁QGYGX₂PFT (SEQ ID NO: 6), де X₁ являє собою Gln, Asn, або Thr і X₂ являє собою Ala, Asn, Gln, або Arg. У деяких варіантах здійснення антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7), GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 21), або
30 GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10) або QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23).

35 У деяких варіантах здійснення антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну
40 послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких варіантах здійснення антитіло додатково містить наступні каркасні ділянки (FR) варіабельного домену важкого ланцюга (VH): (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14);
45 (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 16). У деяких варіантах здійснення антитіло додатково містить FR варіабельного домену легкого ланцюга (VL): (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну
50 послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

У деяких варіантах здійснення антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну
55 послідовність GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23). У деяких варіантах здійснення антитіло додатково містить
60 наступні FR домену VL: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

5 У деяких варіантах здійснення антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVGE (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну
10 послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких варіантах здійснення антитіло додатково містить наступні FR домену VL: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 25), або DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 26); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) або WYQQKPGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 27);
15 (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19) або GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких варіантах здійснення антитіло додатково містить наступні FR домену VH: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) або
20 EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSAAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 32).

25 У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 11, 40 або 42; (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 12, 41, або 46; або (c) домен VH як в (a) і домен VL як в (b). У деяких варіантах здійснення домен VH додатково містить наступні FR: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14) або WVRQEPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 39); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить
30 амінокислотну послідовність WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 16). У деяких варіантах здійснення домен VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11. У деяких варіантах здійснення домен VH додатково містить наступні FR: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 17) або DIQMTQSPSSLSASVGDRVITDC (SEQ ID NO: 45); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність
40 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSATYYC (SEQ ID NO: 44), або GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC (SEQ ID NO: 54); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20) або FGQGTKVEVK (SEQ ID NO: 55).
45 У деяких варіантах здійснення домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

50 У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

55 У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41.

60 У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 33 або 51; (b) домен VL, що містить амінокислотну

послідовність, яка має щонайменше 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 12, 34, 35, 36, 37, або 38; або (c) домен VH як в (a) і домен VL як в (b). У деяких варіантах здійснення антитіло додатково містить наступні FR: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) або
 5 EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32). У деяких
 10 варіантах здійснення домен VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33. У деяких варіантах здійснення домен VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51. У деяких варіантах здійснення антитіло додатково містить наступні FR: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 25), або DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 26); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) або WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) FR-L3, що містить амінокислотну
 15 послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24), або GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких варіантах здійснення домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34. У деяких варіантах здійснення домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35. У деяких варіантах здійснення домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36. У деяких варіантах здійснення домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37. У деяких варіантах здійснення домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. У деяких варіантах здійснення
 20 домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48 і (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50.

У деяких варіантах здійснення за попереднім аспектом антитіло містить (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49 і (b) легкий ланцюг, що містить

амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло здатне інгібувати зв'язування ФРЕС з рецептором ФРЕС. У деяких варіантах здійснення рецептор ФРЕС являє собою рецептор-1 ФРЕС (Flt-1). У деяких варіантах здійснення рецептор ФРЕС являє собою рецептор-2 ФРЕС (KDR).

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло зв'язує людський ФРЕС (hVEGF) з Kd близько 2 нМ або нижче. У деяких варіантах здійснення антитіло зв'язує hVEGF з Kd від близько 75 пМ до близько 2 нМ. У деяких варіантах здійснення антитіло зв'язує hVEGF з Kd від близько 75 пМ до близько 600 пМ. У деяких варіантах здійснення антитіло зв'язує hVEGF з Kd від близько 75 пМ до близько 500 пМ. У деяких варіантах здійснення антитіло зв'язує hVEGF з Kd близько 80 пМ. У деяких варіантах здійснення антитіло зв'язує hVEGF з Kd близько 60 пМ.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло має температуру плавлення (Tm) більш ніж близько 83,5 °C. У деяких варіантах здійснення антитіло має Tm від близько 85 °C до близько 91 °C. У деяких варіантах здійснення антитіло має Tm близько 89 °C.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло має ізоелектричну точку (pI) нижче ніж 8. У деяких варіантах здійснення антитіло має pI від близько 5 до 7. У деяких варіантах здійснення антитіло має pI від близько 5 до близько 6.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло є моноклональним, людським, гуманізованим або химерним.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло являє собою фрагмент антитіла, який зв'язує ФРЕС. У деяких варіантах здійснення фрагмент антитіла вибирають із групи, що складається з фрагментів Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, і (Fab')₂. У деяких варіантах здійснення фрагмент антитіла являє собою Fab.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло являє собою моноспецифічне антитіло. В інших варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло являє собою мультиспецифічне антитіло. У деяких варіантах здійснення мультиспецифічне антитіло являє собою біспецифічне антитіло. У деяких варіантах здійснення біспецифічне антитіло зв'язує ФРЕС і другу біологічну молекулу, вибрану з групи, що складається з інтерлейкіна 1β (ІЛ-1β); інтерлейкіна-6 (ІЛ-6); рецептора інтерлейкіна-6 (ІЛ-6R); інтерлейкіна-13 (ІЛ-13); рецептора ІЛ-13 (ІЛ-13R); ТцФР (тромбоцитарного фактора росту); ангіопоетину; ангіопоетину-2; Tie2; S1P; інтегринів αvβ3, αvβ5 і α5β1; бетацеллюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора D комплементу; ФНП-α; HtrA1; рецептора ФРЕС; ST-2-рецептора; і білка, генетично пов'язаного з ризиком вікової макулярної дистрофії (ВМД). У деяких варіантах здійснення рецептор ФРЕС являє собою ФРЕСР1, ФРЕСР2, ФРЕСР3, зв'язаний з мембраною рецептор ФРЕС (мзФРЕСР), або розчинний рецептор ФРЕС (рФРЕСР). У деяких варіантах здійснення білок, генетично пов'язаний з ризиком ВМД, вибирають із групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора В, фактора Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкіна-8 (ІЛ-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; і TNFRSF10A.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів антитіло являє собою антитіло, сконструйоване введенням цистеїну. У деяких варіантах здійснення антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, містить цистеїнову мутацію у важкому ланцюзі, вибрану з групи, що складається з HC-A118C, HC-A140C, і HC-L174C (нумерація EU), або цистеїнову мутацію у легкому ланцюзі, вибрану з групи, що складається з LC-K149C і LC-V205C (нумерація за Кабатом). У деяких варіантах здійснення цистеїнова мутація у важкому ланцюзі являє собою HC-A118C (нумерація EU). У деяких варіантах здійснення цистеїнова мутація у важкому ланцюзі являє собою HC-A140C (нумерація EU). У деяких варіантах здійснення цистеїнова мутація у важкому ланцюзі являє собою HC-L174C (нумерація EU). У деяких варіантах здійснення цистеїнова мутація у легкому ланцюзі являє собою LC-K149C (нумерація за Кабатом). У деяких варіантах здійснення цистеїнова мутація у легкому ланцюзі являє собою LC-V205C (нумерація за Кабатом). У деяких варіантах здійснення полімер ГК ковалентно приєднаний до антитіла при цистеїновій мутації.

В іншому аспекті будь-який з попередніх кон'югатів антитіл може бути використаний як лікарський засіб.

В іншому аспекті будь-який з попередніх кон'югатів антитіл може бути використаний у виготовленні лікарського засобу для лікування захворювання очей у суб'єкта.

В іншому аспекті будь-який з попередніх кон'югатів антитіл може бути використаний для зниження або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, який має захворювання очей.

В іншому аспекті будь-який з попередніх кон'югатів антитіл може бути використаний для

лікування захворювання очей у суб'єкта.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів захворювання очей вибирають із групи, що складається з вікової макулярної дегенерації (ВМД), макулодистрофії, макулярного набряку, діабетичного макулярного набряку (ДМН) (зокрема фокального нецентрального ДМН і дифузного центрального ДМН), ретинопатії, діабетичної ретинопатії (ДР) (зокрема проліферативної ДР (ПДР), непроліферативної ДР (НПДР), і високогірної ДР), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ретинопатії недоношених (РН), оклюзії вени сітківки (ОВС) (зокрема форм оклюзії центральної вени сітківки (ОЦВС) і гілки центральної вени сітківки (ОГВС)), ХНВ (зокрема міопічної ХНВ), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією сітківки / хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної міопії, хвороби Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, сімейної ексудативної вітреоретинопатії (СЕВ), хвороби Коутса, хвороби Норрі, синдрому остеопорозу-псевдогліоми (OPPG), субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярних захворювань очей, неоваскулярної глаукоми, пігментного ретиніту (ПР), гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангіоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньочочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, кістозного макулярного набряку (КМН), васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (зокрема інфекційного та неінфекційного (наприклад, алергічного) кон'юнктивіту), вродженого амаврозу Лебера, увеїту (зокрема інфекційного та неінфекційного увеїту), хоріоїдиту, гістоплазмозу очей, блефариту, синдрому сухого ока, травматичного пошкодження ока, і синдрому Шегрена. У деяких варіантах здійснення захворювання очей являє собою ВМД, ДМН, ДР, або ОВС. У деяких варіантах захворювання очей являє собою ВМД. У деяких варіантах здійснення ВМД являє собою вологу форму ВМД. У деяких варіантах здійснення захворювання очей являє собою ДМН.

В іншому аспекті винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить будь-який з кон'югатів антитіл, описаних у цьому документі, фармацевтично прийнятний носій, наповнювач, або розріджувач. У деяких варіантах здійснення фармацевтична композиція додатково містить другий агент, при цьому другий агент вибирають з групи, що складається з антитіла, антиангіогенного агента, цитокіна, антагоніста цитокіна, кортикостероїду, анальгетику, і сполуки, яка зв'язується з другою біологічною молекулою. У деяких варіантах здійснення антиангіогенний агент являє собою антагоніст ФРЕС. У деяких варіантах здійснення антагоніст ФРЕС являє собою анти-ФРЕС антитіло, антитіло проти рецептора ФРЕС, злитий білок розчинного рецептора ФРЕС, аптамер, анти-ФРЕС DARPIn[®], або інгібітор тирозинкінази ФРЕСР (рецептор ФРЕС). У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою ранібізумаб (LUCENTIS[®]), RTH-258, або біспецифічне анти-ФРЕС антитіло. У деяких варіантах здійснення біспецифічне анти-ФРЕС антитіло являє собою анти-ФРЕС/анти-Ang2 антитіло. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС/анти-Ang2 антитіло являє собою RG-7716. У деяких варіантах здійснення злитий білок розчинного рецептора ФРЕС являє собою афліберсепт (EYLEA[®]). У деяких варіантах здійснення аптамер являє собою пегаптаніб (MACUGEN[®]). У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС DARPIn[®] являє собою абіципар пегол. У деяких варіантах здійснення інгібітор тирозинкінази ФРЕСР вибирають із групи, що складається з 4-(4-бромо-2-флуораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназоліну (ZD6474), 4-(4-флуоро-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідін-1-ілпропокси)хіназоліну (AZD2171), ваталаніб (PTK787), семаксамінібу (SU5416), і SUTENT[®] (сунітиніб). У деяких варіантах здійснення другу біологічну молекулу вибирають з групи, що складається з ІЛ-1β; ІЛ-6; ІЛ-6R; ІЛ-13; ІЛ-13R; ТцФР; ангіопоетину; ангіопоетину-2; Tie2; S1P; інтегринів αvβ3, αvβ5 і α5β1; бетацеллюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора D комплементу; ФНП-α; HTRA1; рецептора ФРЕС; ST-2-рецептора; і білка, генетично пов'язаного з ризиком ВМД. У деяких варіантах здійснення рецептор ФРЕС являє собою ФРЕСР1, ФРЕСР2, ФРЕСР3, мзФРЕСР або рФРЕСР. У деяких варіантах здійснення білок, генетично пов'язаний з ризиком ВМД, вибирають із групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора В, фактора Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; ІЛ-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення сполука, яка зв'язує другу біологічну молекулу, являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах здійснення антигензв'язуючий фрагмент антитіла вибирають із групи, що складається з фрагментів Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, і (Fab')₂. У деяких варіантах здійснення антигензв'язуючий фрагмент антитіла являє собою Fab.

В іншому аспекті будь-яка з попередніх фармацевтичних композицій може бути використана як лікарський засіб.

В іншому аспекті будь-яка з попередніх фармацевтичних композицій може бути використана

у виготовленні лікарського засобу для лікування захворювання очей у суб'єкта.

В іншому аспекті будь-яка з попередніх фармацевтичних композицій може бути використана для зниження або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, який має захворювання очей.

В іншому аспекті будь-яка з попередніх фармацевтичних композицій може бути використана для лікування захворювання очей у суб'єкта.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів захворювання очей вибирають із групи, що складається з вікової макулярної дегенерації (ВМД), макулодистрофії, макулярного набряку, діабетичного макулярного набряку (ДМН) (зокрема фокального нецентрального ДМН і дифузного центрального ДМН), ретинопатії, діабетичної ретинопатії (ДР) (зокрема проліферативної ДР (ПДР), непроліферативної ДР (НПДР), і високогірної ДР), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ретинопатії недоношених (РН), оклюзії вени сітківки (ОВС) (зокрема форм оклюзії центральної вени сітківки (ОЦВС) і гілки центральної вени сітківки (ОГВС)), ХНВ (зокрема міопічної ХНВ), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією сітківки / хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної міопії, хвороби Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, сімейної ексудативної вітреоретинопатії (СЕВ), хвороби Коутса, хвороби Норрі, синдрому остеопорозу-псевдогліоми (OPPG), субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярних захворювань очей, неоваскулярної глаукоми, пігментного ретиніту (ПР), гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангиоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, кістозного макулярного набряку (КМН), васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (зокрема інфекційного та неінфекційного (наприклад, алергічного) кон'юнктивіту), вродженого амаврозу Лебера, увеїту (зокрема інфекційного та неінфекційного увеїту), хоріоїдиту, гістоплазмозу очей, блефариту, синдрому сухого ока, травматичного пошкодження ока, і синдрому Шегрена. У деяких варіантах здійснення захворювання очей являє собою ВМД, ДМН, ДР, або ОВС. У деяких варіантах захворювання очей являє собою ВМД. У деяких варіантах здійснення ВМД являє собою вологу форму ВМД. У деяких варіантах здійснення захворювання очей являє собою ДМН.

В іншому аспекті винахід відноситься до способу зниження або інгібування ангиогенезу у суб'єкта, який має захворювання очей, що включає введення суб'єкту ефективної кількості будь-якого з кон'югатів антитіл, описаних у цьому документі, або будь-якої з фармацевтичних композицій, описаних у цьому документі, тим самим зменшуючи або інгібуючи ангиогенез у суб'єкта.

В іншому аспекті винахід відноситься до способу лікування захворювання очей, що включає введення ефективної кількості будь-якого з кон'югатів антитіл, описаних у цьому документі, або будь-якої з фармацевтичних композицій, описаних у цьому документі, суб'єкту, який потребує таке лікування.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів захворювання очей вибирають із групи, що складається з вікової макулярної дегенерації (ВМД), макулодистрофії, макулярного набряку, діабетичного макулярного набряку (ДМН) (зокрема фокального нецентрального ДМН і дифузного центрального ДМН), ретинопатії, діабетичної ретинопатії (ДР) (зокрема проліферативної ДР (ПДР), непроліферативної ДР (НПДР), і високогірної ДР), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ретинопатії недоношених (РН), оклюзії вени сітківки (ОВС) (зокрема форм оклюзії центральної вени сітківки (ОЦВС) і гілки центральної вени сітківки (ОГВС)), ХНВ (зокрема міопічної ХНВ), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією сітківки / хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної міопії, хвороби Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, сімейної ексудативної вітреоретинопатії (СЕВ), хвороби Коутса, хвороби Норрі, синдрому остеопорозу-псевдогліоми (OPPG), субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярних захворювань очей, неоваскулярної глаукоми, пігментного ретиніту (ПР), гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангиоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, кістозного макулярного набряку (КМН), васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (зокрема інфекційного та неінфекційного (наприклад, алергічного) кон'юнктивіту), вродженого амаврозу Лебера, увеїту (зокрема інфекційного та неінфекційного увеїту), хоріоїдиту, гістоплазмозу очей, блефариту, синдрому сухого ока, травматичного пошкодження ока, і синдрому Шегрена. У деяких варіантах здійснення захворювання очей являє собою ВМД, ДМН, ДР, або ОВС. У деяких варіантах захворювання очей являє собою ВМД. У деяких варіантах здійснення ВМД являє собою вологу форму ВМД. У деяких варіантах здійснення захворювання очей являє собою ДМН.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів спосіб додатково включає введення суб'єкту ефективної кількості другого агента, причому другий агент вибирають з групи, що складається з антитіла, антиангіогенного агента, цитокіна, антагоніста цитокіна, кортикостероїду, анальгетику, і сполуки, яка зв'язується з другою біологічною молекулою. У деяких варіантах здійснення антиангіогенний агент являє собою антагоніст ФРЕС. У деяких варіантах здійснення антагоніст ФРЕС являє собою анти-ФРЕС антитіло, антитіло проти рецептора ФРЕС, злитий білок розчинного рецептора ФРЕС, аптамер, анти-ФРЕС DARPIn®, або інгібітор тирозинкінази ФРЕСР (рецептор ФРЕС). У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою ранібізумаб (LUCENTIS®), RTH-258, або біспецифічне анти-ФРЕС антитіло. У деяких варіантах здійснення біспецифічне анти-ФРЕС антитіло являє собою анти-ФРЕС/анти-Ang2 антитіло. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС/анти-Ang2 антитіло являє собою RG-7716. У деяких варіантах здійснення злитий білок розчинного рецептора ФРЕС являє собою афліберсепт (EYLEA®). У деяких варіантах здійснення аптамер являє собою пегаптаніб (MACUGEN®). У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС DARPIn® являє собою абіципар пегол. У деяких варіантах здійснення інгібітор тирозинкінази ФРЕСР вибирають із групи, що складається з 4-(4-бромо-2-флуораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназоліну (ZD6474), 4-(4-флуоро-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідин-1-ілпропокси)хіназоліну (AZD2171), ваталанібу (PTK787), семаксамінібу (SU5416), і SUTENT® (сунітинібу). У деяких варіантах здійснення другу біологічну молекулу вибирають з групи, що складається з ІЛ-1 β ; ІЛ-6; ІЛ-6R; ІЛ-13; ІЛ-13R; ТцФР; ангіопоетину; ангіопоетину-2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ і $\alpha5\beta1$; бетацеллюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора D комплементу; ФНП- α ; HTRA1; рецептора ФРЕС; ST-2-рецептора; і білка, генетично пов'язаного з ризиком ВМД. У деяких варіантах здійснення рецептор ФРЕС являє собою ФРЕСР1, ФРЕСР2, ФРЕСР3, мзФРЕСР або рФРЕСР. У деяких варіантах здійснення білок, генетично пов'язаний з ризиком ВМД, вибирають із групи, що складається з компонентів шляху комплементу C2, фактора В, фактора Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; ІЛ-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CЕТР; LIPC, COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення сполука, яка зв'язує другу біологічну молекулу, являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. У деяких варіантах здійснення антигензв'язуючий фрагмент антитіла вибирають із групи, що складається з фрагментів Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, і (Fab')₂.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів кон'югат антитіла або фармацевтичну композицію вводять інтравітально, через око, інтраокулярно, у навколосклеральну область, у субтеноновий простір, у супраорбітальний простір, місцево, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, інтрадермально, чрезшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньочеревно, внутрішньовогнищево, інтракраніально, внутрішньосуглобово, внутрішньопростатно, внутрішньоплеврально, інтратрахеально, інтратекально, інтраназально, інтравагінально, ректально, місцево, внутрішньопухлинно, внутрішньочеревно, інтравентрикулярно, підшкірно, субкон'юнктивально, внутрішньопузирно, через слизову оболонку, інтраперикардіально, внутрішньопуповинно, інтраорбітально, перорально, місцево, трансдермально, шляхом інгаляції, шляхом ін'єкції, у вигляді очних крапель, шляхом імплантації, шляхом інфузії, шляхом безперервної інфузії, шляхом локалізованої перфузії безпосередньо через клітини-мішені, за допомогою катетера, за допомогою лаважу, у кремах або в ліпідних композиціях. У деяких варіантах здійснення кон'югат антитіла або фармацевтичну композицію вводять у склоподібне тіло, через око, інтраокулярно, у навколосклеральну область, у субтеноновий простір, у супраорбітальний простір, або місцево. У деяких варіантах здійснення кон'югат антитіла або фармацевтичну композицію вводять шляхом ін'єкції в склоподібне тіло. У деяких варіантах здійснення кон'югат антитіла або фармацевтичну композицію вводять місцево у вигляді очних крапель або мазі. У деяких варіантах здійснення кон'югат антитіла або фармацевтичну композицію вводять за допомогою пристрою доставки, що імплантується.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх аспектів суб'єкт являє собою людину.
СТИСЛИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На Фіг. 1А представлено графік, що демонструє розподіл сукупності молекулярних мас (у поняттях молярної маси) у репрезентативній вибірці 200 кДа ГК.

На Фіг. 1В представлено графік, що демонструє розподіл сукупності числа малеїмідів на ланцюзі ГК масою 200 кДа в результаті моделювання стохастичної модифікації за методом Монте-Карло для кожної кислотної групи, що має 5 % імовірність модифікації.

На Фіг. 1С представлено графік, що демонструє полідисперсність 40 кДа, 200 кДа і 600 кДа полімерів ГК. У Таблиці нижче графіка продемонстрована середньочисельна молекулярна маса (Mn), середньомасова молекулярна маса (Mw), індекс полідисперсності (PDI), і діапазон

молекулярної маси (MW) (у термінах Mw) для зазначених зразків.

На Фіг. 2 представлена серія графіків, які демонструють, що кон'югати ГК-G6.31.AARR мають відмінності у фізичній стабільності за фізіологічно відповідних умов стресу, як оцінювали за допомогою гель-ексклюзійної хроматографії (EX) з підключеним рефрактометричним детектором (RI) і детектором багатокутного лазерного світлорозсіювання (MALS) (SEC-RI-MALS). Серії міток відносяться до молекулярної маси остова ГК (40 кДа ("40K"); 200 кДа ("200K") і 600 кДа ("600K") і рівню завантаження Fab.

На Фіг. 3 представлена серія графіків, що демонструють зміни в профілях утримування SEC з плином часу для HA40K-G6.31.AARR-4,7 % (ліва панель), HA200K-G6.31.AARR-4,7 % (центральна панель), і HA600K-G6.31.AARR-2,1 % (права панель), демонструючи, що час утримування SEC зсувається на більш пізній час (менше гідродинамічного розміру), зі ступенем цього зсуву в залежності від молекулярної маси остова ЦК.

На Фіг. 4 представлена серія графіків, що демонструють дані SEC-RI-MALS на графіку як кумулятивну масову частку для HA40K-G6.31.AARR-4,7 % (ліва панель), HA200K-G6.31.AARR-4,7 % (центральна панель), і HA600K-G6.31.AARR-2,1 % (права панель).

На Фіг. 5 представлено графік, що демонструє результати SEC-RI-MALS характеристики комерційної полідисперсної ГК (чорний) і монодисперсної ГК (сірий), які демонструють відмінність у масових розподілах між двома способами виробництва. У таблиці на правій панелі наведені значення M_n , M_w , і PDI, що визначаються цим аналізом.

На Фіг. 6 представлено графік, що демонструє результати SEC-RI-MALS характеристики комерційної полідисперсної HA200K-G6.31.AARR (чорний) і монодисперсної HA150K-G6.31.AARR (сірий), які демонструють відмінність у масових розподілах. У таблиці на правій панелі наведені значення M_n , M_w , і PDI, що визначаються цим аналізом.

На Фіг. 7 представлено схематичне зображення, яке демонструє, що стандартні молекули формату Fab-C розробляються так, щоб утримувати вільний цистеїновий залишок придатний для кон'югації шляхом збільшення стандартної послідовності шарнірного пептиду Fab з першим або другим дисульфідним цистеїном шарнірної ділянки. Для того, щоб мінімізувати або запобігти скремблюванню між міжланцюговим дисульфідом і цим вільним залишком цистеїну, цистеїн замість цього може бути мутований на поверхні Fab у місці, яке просторово відокремлено від міжланцюгового дисульфиду (званий в цьому документі як "tio-Fab").

На Фіг. 8A-8C представлено ряд схематичних зображень, що демонструють, що гнучкість і просторова близькість послідовності шарніра може призвести до перебудови в трьох можливих дисульфідних станах залишаючи три різних залишки цистеїну, доступними для кон'югації. На Фіг. 8A представлена передбачувана конфігурація, в якій цистеїн шарнірної послідовності зменшується і доступний для кон'югації. На Фіг. 8B показаний варіант циклізованого важкого ланцюга (HC), в якому цистеїн шарнірної ділянки утворює дисульфідні зв'язки із залишком цистеїну HC, який зазвичай є частиною міжланцюгового дисульфідного зв'язку, в результаті чого цистеїн у легкому ланцюзі (LC) міжланцюгового дисульфідного зв'язку доступний для кон'югації. На Фіг. 8C показаний варіант LC, в якому цистеїн шарніра утворює дисульфідні зв'язки з цистеїном LC, який зазвичай утворює частину міжланцюгового дисульфідного зв'язку, в результаті чого цистеїн у HC міжланцюгового дисульфідного зв'язку доступний для кон'югації.

На Фіг. 9 показана серія графіків, що демонструють результати серії експериментів з maleimідним кепуванням і обмеженого Lys-C розщеплення, які виконані на G6.31.AARR.Fab-C і проаналізовані за допомогою обернено-фазової недефективної рідинної хроматографії/часопролітної (RP-UPLC-TOF) мас-спектрометрії. Числа над піками є сумарною кількістю іонів для цього піку і є мірою площі піка.

На Фіг. 10A і 10B представлена серія графіків, що демонструють результати обмеженого розщеплення Lys-C (Фіг. 10A) і гіалуронідазою (HAase) (Фіг. 10B) кон'югату ГК-G6.31.AARR, що підтверджує наявність кон'югованих варіантів, асоційованих з кон'югацією за допомогою обох цистеїнів, нормально захоплених міжланцюговим дисульфідним зв'язком.

На Фіг. 11 представлена серія графіків, які демонструють, що кон'югація tio-Fab G6.31.AARR з HA200K-maleimідом протікала нормально в порівнянні з G6.31.AARR.Fab-C, хоча ступінь перетворення Fab у кон'югат була нижче для зразків tio-Fab.

На Фіг. 12 представлено графік, що демонструє декон'югацію моделі полімеру поліетиленгліколь (ПЕГ)-maleimід з G6.31.AARR різних форматів у PBS+2 mM окисненого глутатіону (GSSG) за 37 °C, яку оцінювали за допомогою RP-UPLC-TOF.

На Фіг. 13A показана схема нумерації за Кабатом для легкого ланцюга 4D5.

На Фіг. 13B показана схема послідовної нумерації (лівий стовпець), що починається з N-кінця у порівнянні зі схемою нумерації за Кабатом (середній стовпець) і схемою нумерації EU (правий стовпець) для антитіла 4D5.

На Фіг. 14 представлено графік, який демонструє, що кон'югати GK-G6.31.AARR, отримані з монодисперсних ГК, демонструють поліпшену фізичну стабільність в умовах фізіологічного стресу на четвертому тижні у порівнянні з кон'югатами GK-G6.31.AARR аналогічного розміру, отриманими з полідисперсної ГК. У таблиці на правій панелі продемонстрована M_w (кДа) на 0-й, 2-й і 4-й тижень.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС СУТІ ВИНАХОДУ

I. ВИЗНАЧЕННЯ

Термін "близько" в цьому документі, відноситься до звичайного діапазону помилок для відповідного значення і добре відомий фахівцю в цій галузі техніки. У цьому документі застосування "близько" по відношенню до величини або параметру включає (і описує) варіанти здійснення, які відносяться безпосередньо до цієї величини або параметру по суті.

В контексті цього документа "акцепторна каркасна ділянка людини" являє собою каркасну ділянку, яка містить амінокислотну послідовність каркасної ділянки варіабельного домену легкого ланцюга (VL) або каркасної ділянки варіабельного домену важкого ланцюга (VH), яка отримана з каркасної ділянки імунoglobulin людини чи консенсусної каркасної ділянки людини, як визначено нижче. Акцепторна каркасна ділянка людини, "отримана з" каркасної ділянки імунoglobulin людини чи консенсусної каркасної ділянки людини, може містити таку ж саму амінокислотну послідовність, як і зазначена, або може містити зміни в амінокислотній послідовності. У деяких варіантах здійснення кількість амінокислотних змін становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше, або 2 або менше. У деяких варіантах здійснення послідовність акцепторної людської каркасної ділянки VL ідентична послідовності каркасної ділянки VL імунoglobulin людини або послідовності консенсусної каркасної ділянки людини.

Термін "афінність" відноситься до інтенсивності сумарних загальних нековалентних взаємодій між одиночним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитіла) та її партнера по зв'язуванню (наприклад, антигена). Якщо не вказано інше, що використовується в цьому документі термін "афінність зв'язування" відноситься до дійсної афінності зв'язування, яка відображає взаємодію у співвідношенні 1:1 між членами зв'язуючої пари (наприклад, антитілом і антигеном). Афінність молекули X до її партнера Y, як правило, можна представити у вигляді константи дисоціації (K_d). Афінність можна виміряти за допомогою загальноприйнятих у цій галузі техніки способів, зокрема тих, які описані в цьому документі. Конкретні ілюстративні та типові варіанти здійснення винаходу, що відносяться до вимірювання афінності зв'язування, описані далі.

Антитіло з "дозрілою афінністю" відноситься до антитіла з однією або більше змінами в одній або більше гіперваріабельних ділянках (HVR) і/або каркасних ділянках (FR) у порівнянні з вихідним антитілом, яке не містить таких змін, при цьому зазначені зміни призводять до поліпшення афінності антитіла по відношенню до антигена.

Термін "фактор росту ендотелію судин" або "ФРЕС" відноситься до білка фактора росту ендотелію судин-A, прикладом якого є SEQ ID NO: 47 (див. також Swiss Prot, номер доступу P15692, Gene ID (NCBI): 7422). Термін "ФРЕС" включає білок, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47, а також його гомологи та ізоформи. Термін "ФРЕС" також охоплює відомі ізоформи, наприклад, сплайсовані ізоформи, ФРЕС, наприклад, ФРЕС₁₁₁, ФРЕС₁₂₁, ФРЕС₁₄₅, ФРЕС₁₆₅, ФРЕС₁₈₉, і ФРЕС₂₀₆, разом з його природними алельними і процесованими формами, зокрема фактор росту ендотеліальних клітин людини, що складається з 110 амінокислот, утворених розщепленням плазміном ФРЕС₁₆₅, як описано у Ferrara Mol. Biol. Cell. 21:687 (2010), Leung et al., Science, 246:1306 (1989), та Houck et al., Mol. Endocrin., 5:1806 (1991). Термін "ФРЕС" також відноситься до ФРЕС видів, які не є людиною, наприклад, миші, щура або примату. Іноді ФРЕС з конкретного виду позначають такими термінами, як hVEGF для людського ФРЕС, mVEGF для мишачого ФРЕС і т. п. Термін "ФРЕС" також використовується для позначення укорочених форм поліпептиду, що містять амінокислоти від 8 до 109 або від 1 до 109 з 165 амінокислот від фактора росту судинних ендотеліальних клітин людини. Посилання на будь-які такі форми ФРЕС може бути ідентифіковане у цій заявці, наприклад, за допомогою "ФРЕС₁₀₉", "ФРЕС (8-109)", "ФРЕС (1-109)" або "ФРЕС₁₆₅". Положення амінокислот для "усіченого" нативного ФРЕС пронумеровані так само, як зазначено у нативній послідовності ФРЕС. Наприклад, положення амінокислоти 17 (метіоніну) процесованому нативному ФРЕС являє собою позицію 17 (метіоніну) у нативному ФРЕС. Усічений нативний ФРЕС має афінність зв'язування для рецепторів KDR і Flt-1, яку можна порівняти з нативним ФРЕС. Термін "варіант ФРЕС", що використовується в цьому документі, належить до поліпептиду ФРЕС, який містить одну або більше амінокислотних мутацій в нативній послідовності ФРЕС. Необов'язково, одна або більше амінокислотних мутацій містить амінокислотну заміну (заміни). В контексті

скороченого позначення варіантів ФРЕС, описаних у цьому документі, зазначається, що числа відносяться до позиції амінокислотного залишку амінокислотної послідовності передбачуваного нативного ФРЕС (вказана в Leung et al., раніше і Houck et al., раніше). Якщо не зазначено інше, термін "ФРЕС", що використовується в цьому документі, означає ФРЕС-А.

Терміни "анти-ФРЕС антитіло", і "антитіло, яке зв'язується з ФРЕС", і "антитіло, яке специфічно зв'язує ФРЕС" відносяться до антитіла, яке здатне зв'язувати ФРЕС з достатньою афінністю так, щоб антитіло можна було застосовувати як діагностичний та/або терапевтичний агент для націлювання на ФРЕС. В одному варіанті здійснення ступінь зв'язування анти-ФРЕС антитіла з неспорідненим білком, що не є ФРЕС, становить менш ніж близько 10 % від зв'язування антитіла з ФРЕС, як виміряно, наприклад, за допомогою радіоімунологічного аналізу (RIA). У деяких варіантах здійснення антитіло, яке зв'язується з ФРЕС, має константу дисоціації (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ, або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М). У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло зв'язується з епітопом ФРЕС, який є консервативним серед ФРЕС з різних видів.

Термін "антитіло" застосовується в цьому документі в самому широкому сенсі і включає різні структури антитіл, включно з, але не обмежуючись цим, моноклональними антитілами, поліклональними антитілами, мультиспецифічними антитілами (наприклад, біспецифічними антитілами) і фрагментами антитіл, за умови, що вони демонструють необхідну антигензв'язуючу активність.

"Фрагмент антитіла" відноситься до молекули, відмінної від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла, яка зв'язує антиген, з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіл включають, але не обмежуються цим, Fv, Fab, Fab', Fab-C, Fab'-SH, F(ab')₂; діатіла; лінійні антитіла; молекули одноланцюгових антитіл (наприклад, scFv) і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл. У деяких випадках приклади фрагментів антитіла включають, але не обмежуються ними, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; діатіла; лінійні антитіла; молекули одноланцюгових антитіл (наприклад, scFv) і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

У разі розщеплення антитіл папаїном утворюються два ідентичних антигензв'язуючих фрагмента, які називаються фрагментами "Fab", і залишковий фрагмент "Fc", назва якого відображає його здатність до легкої кристалізації. Fab-фрагмент складається з цілого легкого (L) ланцюга разом з доменом варіабельної ділянки важкого (H) ланцюга (VH) і першим константним доменом з одного важкого ланцюга (CH1). Обробка антитіла пепсином дозволяє виділити одиночний великий фрагмент F(ab')₂, який приблизно відповідає двом фрагментами Fab з бівалентною антигензв'язуючою активністю, що з'єднані дисульфідним зв'язком, і який зберігає здатність до перехресного зшивання антигена. Фрагменти Fab' відрізняються від фрагментів Fab тим, що мають кілька додаткових залишків на карбоксильному кінці домену CH1, включно з одним або більше цистеїнами з шарнірної ділянки антитіла. Молекули Fab-C являють собою молекули Fab, які експресуються таким чином, що послідовність скорочується при першому цистеїні шарнірної ділянки, що призводить до Fab з вільним цистеїном безпосередньо під час експресії (див., наприклад, Shatz et al. Mol. Pharmaceutics 2016; PubMed identifier (PMID) 27244474). Наприклад, молекула Fab-C може мати вільний цистеїн у позиції Cys227 важкого ланцюга. В інших випадках молекула Fab-C може мати вільний цистеїн у позиції Cys229 важкого ланцюга. У цьому документі Fab'-SH являє собою позначення Fab', в якому цистеїновий(і) залишок(и) константних доменів має вільну тіольну групу. Фрагменти F(ab')₂ антитіл спочатку отримували як пари фрагментів Fab', які з'єднані між собою цистеїнами шарнірної ділянки. Також відомі інші хімічні сполуки фрагментів антитіла.

У цьому документі термін "ділянка Fc" вживається для позначення C-кінцевої ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну, яка містить щонайменше частину константної ділянки. Цей термін включає нативні послідовності ділянок Fc і варіанти ділянок Fc. В одному варіанті здійснення ділянка Fc важкого ланцюга людського IgG знаходиться в межах від Cys226 або від Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак, ділянка Fc може містити або не містити C-кінцевий лізин (Lys447). Якщо не вказано інше, нумерація амінокислотних залишків ділянки Fc або константної ділянки відповідно до системи нумерації EU, також званої індексом EU, як описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

"Fv" складається з димеру одного домену варіабельної ділянки важкого ланцюга і одного домену варіабельної ділянки легкого ланцюга, жорстко зв'язаних за допомогою нековалентних зв'язків. Під час згортання цих двох доменів назовні виступають шість гіперваріабельних петель (по 3 петлі з H - і L-ланцюга), амінокислотні залишки, які беруть участь у зв'язуванні з антигеном

і надають антитілу специфічність по відношенню до зв'язування антигена. У той самий час навіть один варіабельний домен (або половина Fv, що містить тільки три HVR, специфічні до антигена) має здатність розпізнавати і зв'язувати антиген, хоча часто з більш низькою афінністю, ніж цілий сайт зв'язування.

"Одноланцюгові Fv", які також мають аббревіатуру "sFv" або "scFv", являють собою фрагменти антитіл, які містять домени антитіл VH і VL, зв'язані в один поліпептидний ланцюг. Переважно, поліпептид sFv також містить унікальний поліпептидний лінкер між доменами VH і VL, що дозволяє sFv утворювати структуру, необхідну для зв'язування з антигеном. Для огляду sFv, див. Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Термін "діатіла" відноситься до невеликих фрагментів антитіл, які отримані конструюванням фрагментів sFv (див. попередній абзац) з короткими лінкерами (близько 5-10 залишків) між доменами VH і VL, завдяки чому досягається міжланцюгове, а не внутрішньоланцюгове сполучення V-доменив, що приводить до утворення бівалентного фрагмента, тобто фрагмента, що несе два антигензв'язуючих сайти. Біспецифічні антитіла являють собою гетеродимери двох "кросоверних" фрагментів sFv, в яких домени VH і VL двох антитіл представлені на різних поліпептидних ланцюгах. Діатіла більш докладно описані, наприклад, в EP 404097; WO 93/11161; і Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

"Блокуюче" антитіло або "антагоністичне" антитіло являє собою антитіло, яке інгібує або знижує біологічну активність антигена, який воно зв'язує. Деякі блокуючі антитіла або антагоністичні антитіла в значній мірі або повністю інгібують біологічну активність антигена.

"Антитіло, яке зв'язується з тим самим епітопом", як і еталонне антитіло, відноситься до антитіла, яке блокує зв'язування еталонного антитіла з його антигеном у конкурентному аналізі на 50 % або більше, і, навпаки, еталонне антитіло блокує зв'язування антитіла з його антигеном у конкурентному аналізі на 50 % або більше. У цьому документі пропонується ілюстративний конкурентний аналіз.

Термін "химерне" антитіло відноситься до антитіла, в якому частина важкого та/або легкого ланцюга отримана з конкретного джерела або виду, в той час як залишок важкого та/або легкого ланцюга отриманий з іншого джерела або виду.

"Клас" антитіла відноситься до типу константного домену або константної ділянки, що міститься в його важкому ланцюзі. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і деякі з них можуть бути підрозділені на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, і IgA₂. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються α , δ , ϵ , γ , і μ , відповідно.

"Антитіло, сконструйоване введенням цистеїну", або "варіант антитіла, сконструйованого введенням цистеїну", являє собою антитіло, в якому один або більше залишків антитіла, заміщені залишками цистеїну. У деяких випадках антитіла, сконструйовані введенням цистеїну, можуть бути віднесені до антитіл TH1OMAB™ або антитіл тіо-Fab. Тіольна(і) група(и) з антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, може бути кон'югована з іншими компонентами, наприклад, полімерами (наприклад, полімерами ГК, зокрема монодисперсними полімерами ГК). У конкретних варіантах здійснення заміщені залишки розташовані в доступних сайтах антитіла. Таким чином, у результаті заміни таких залишків на цистеїн, групи, реакційноздатні до тіолу, розташовуються в доступних сайтах антитіла і можуть бути використані для кон'югації антитіла з іншими компонентами, такими як полімери (наприклад, полімери ГК). Так, наприклад, антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може представляти собою антитіло з однією мутацією нецистеїнового нативного залишку на цистеїн у легкому ланцюзі (наприклад, LC-G64C, LC-I106C, LC-R108C, LC-R142C, або LC-K149C відповідно до нумерації за Кабатом) або у важкому ланцюзі (наприклад, HC-D101C, HC-V184C, або HC-T205C відповідно до нумерації за Кабатом, або HC-T114C, HC-A140C, HC-L174C, HC-L179C, HC-T187C, HC-T209C, HC-V262C, HC-G371C, HC-Y373C, HC-E382C, HC-S424C, HC-N434C, і HC-Q438C відповідно до нумерації EU (наприклад, HC-A136C відповідно до нумерації за Кабатом являє собою HC-A140C відповідно до нумерації EU)) (див. 13A і 13B). В особливих випадках антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може містити цистеїнову мутацію у важкому ланцюзі, вибрану з групи, що складається з HC-A118C, HC-A140C, і HC-L174C (нумерація EU), або цистеїнову мутацію у легкому ланцюзі, вибрану з групи, що складається з LC-V205C і LC-K149C (нумерація за Кабатом). У деяких випадках антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, має одну цистеїнову мутацію або у важкому або у легкому ланцюзі, так що кожне повнорозмірне антитіло (тобто антитіло з двома важкими ланцюгами та двома легкими ланцюгами) має два сконструйованих залишки цистеїну, і кожен фрагмент Fab має один модифікований залишок цистеїну. В інших випадках, антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, має більше однієї

цистеїнової мутації (наприклад, 2, 3, 4 або 5 цистеїнових мутацій).

"Вільна амінокислота цистеїн" відноситься до залишку амінокислоти цистеїну, який введений під час конструювання у вихідне антитіло, має тіолову функціональну групу (-SH), і не є спареним як внутрішньомолекулярний або міжмолекулярний дисульфідний місток.

5 Термін "значення реакційної здатності тіолу" являє собою кількісну характеристику реакційної здатності вільних цистеїнових амінокислот. Значення реакційної здатності тіолу являє собою відсоток вільної амінокислоти цистеїну в антитілі, сконструйованому введенням цистеїну, що вступає в реакцію з реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, і перетворений до максимального значення 1. Наприклад, вільна амінокислота цистеїн в антитілі, сконструйованому введенням цистеїну, яка вступає в реакцію з 100 % виходом з реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, таким як біотин-малеїмідний реагент, з формуванням міченого біотином антитіла, має значення реакційної здатності тіолу, рівне 1,0. Інша амінокислота цистеїн, введена під час конструювання в таке саме або інше вихідне антитіло, яка вступає в реакцію з 90 % виходом із реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, має значення реакційної здатності тіолу 0,9. Інша амінокислота цистеїн, введена під час конструювання в таке саме або інше вихідне антитіло, яка вступає в реакцію з 80 % виходом із реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, має значення реакційної здатності тіолу 0,8. Інша амінокислота цистеїн, введена під час конструювання в таке саме або інше вихідне антитіло, яка вступає в реакцію з 70 % виходом із реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, має значення реакційної здатності тіолу 0,7. Інша амінокислота цистеїн, введена під час конструювання в таке саме або інше вихідне антитіло, яка вступає в реакцію з 60 % виходом із реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, має значення реакційної здатності тіолу 0,6. Інша амінокислота цистеїн, введена під час конструювання в таке саме або інше вихідне антитіло, яка вступає в реакцію з 50 % виходом із реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, має значення реакційної здатності тіолу 0,5. Інша амінокислота цистеїн, введена під час конструювання в таке саме або інше вихідне антитіло, яка вступає в реакцію з 40 % виходом із реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, має значення реакційної здатності тіолу 0,4. Інша амінокислота цистеїн, введена під час конструювання в таке саме або інше вихідне антитіло, яка вступає в реакцію з 30 % виходом із реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, має значення реакційної здатності тіолу 0,3. Інша амінокислота цистеїн, введена під час конструювання в таке саме або інше вихідне антитіло, яка вступає в реакцію з 20 % виходом із реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, має значення реакційної здатності тіолу 0,2. Інша амінокислота цистеїн, введена під час конструювання в таке саме або інше вихідне антитіло, яка вступає в реакцію з 10 % виходом із реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, має значення реакційної здатності тіолу 0,1. Інша амінокислота цистеїн, введена під час конструювання в таке саме або інше вихідне антитіло, яка зовсім не вступає в реакцію із реакційноздатним по відношенню до тіолу реагентом, має значення реакційної здатності тіолу 0. Визначення значення реакційної здатності тіолу конкретного цистеїну можна проводити за допомогою ІФА (наприклад, аналізу PHESELECTOR, як описано в цьому документі), мас-спектроскопії, рідинної хроматографії, радіоавтографії або інших кількісних аналітичних тестів.

"Вихідне антитіло" являє собою антитіло, що містить амінокислотну послідовність, в якій один або більше амінокислотних залишків замінують на один або більше залишків цистеїну. Вихідне антитіло може містити нативну послідовність або послідовність дикого типу. Вихідне антитіло може мати передіснуючі модифікації амінокислотної послідовності (такі як додавання, делеції та/або заміни) порівняно з іншими природними формами, формами дикого типу або модифікованими формами антитіла. Вихідне антитіло може бути націлене проти цільового антигена, що являє інтерес, наприклад, біологічно важливого поліпептиду, такого як ФРЕС. Будь-яке з описаних в цьому документі антитіл (наприклад, анти-ФРЕС антитіло) може бути вихідним антитілом.

50 "Ефекторні функції" відносяться до тих видів біологічної активності, властивої ділянці Fc антитіла, які змінюються в залежності від ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають: зв'язування C1q і комплементзалежну цитотоксичність (K3L); зв'язування Fc-рецептора; антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність (A3KL); фагоцитоз; зниження експресії рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора) та активацію B-клітин.

55 "Каркас", або "каркасна ділянка", або "FR" відноситься до залишків варіабельного домену, відмінним від залишків гіперваріабельної ділянки (HVR). FR варіабельного домену зазвичай складається з чотирьох доменів FR: FR1, FR2, FR3 та FR4.

У цьому документі терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" і "ціле антитіло" є взаємозамінними і відносяться до антитіла, структура якого практично аналогічна структурі

нативного антитіла, або яке містить важкі ланцюги, що містять ділянку Fc, описану в цьому документі.

"Людське антитіло" являє собою антитіло, яке має амінокислотну послідовність, яка відповідає послідовності антитіла, що продукується організмом людини або клітиною людини, або яке отримане з джерела, відмінного від людини, в якому використовується набір людських антитіл або інших послідовностей, що кодують антитіла людини. З цього визначення антитіла людини, зокрема, виключено гуманізоване антитіло, що містить антигензв'язуючі залишки нелюдського походження.

"Консенсусна каркасна ділянка людини" являє собою каркасну ділянку, яка містить амінокислотні залишки, що найбільш часто трапляються, під час вибору послідовностей каркасної ділянки VL або VH імунoglobуліну людини. Як правило, послідовності VL або VH імунoglobуліну людини вибирають із послідовностей підгрупи варіабельних доменів. Як правило, підгрупа послідовностей являє собою підгрупу за класифікацією Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. В одному варіанті здійснення для VL підгрупа являє собою підгрупу капла I згідно з Kabat et al., вище. В одному варіанті здійснення для VH підгрупа являє собою підгрупу III згідно з Kabat et al., вище.

"Гуманізовані" форми нелюдських (наприклад, гризуна) антитіл являють собою химерні антитіла, які містять мінімальну послідовність, отриману з нелюдського антитіла. У більшості випадків, гуманізовані антитіла являють собою імунoglobуліни людини (реципієнтне антитіло), в яких залишки гіперваріабельної ділянки реципієнта замінені залишками гіперваріабельної ділянки нелюдського виду (донорське антитіло), такого як миша, щур, кролик або примат, крім людини, що має необхідну специфічність, афінність й активність антитіла. У деяких випадках залишки FR людського імунoglobуліну замінені відповідними нелюдськими залишками. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, які не трапляються в реципієнтному антитілі або донорському антитілі. Ці модифікації проведені для додаткового покращення характеристик антитіл. Загалом, гуманізоване антитіло буде містити практично всі з щонайменше одного, а зазвичай двох варіабельних доменів, у яких всі або майже всі гіперваріабельні петлі відповідають таким ділянкам імунoglobуліну нелюдського походження, а всі або практично всі FR відповідають таким ділянкам послідовності імунoglobуліну людини. Гуманізоване антитіло також необов'язково буде містити щонайменше частину константної ділянки імунoglobуліну (Fc), як правило, з людського імунoglobуліну. Для отримання більш детальної інформації див. Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); і Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Термін "варіабельний" відноситься до того факту, що серед антитіл деякі сегменти варіабельних доменів сильно розрізняються у послідовностях. Варіабельний або "V"-домен опосередковує антигенне зв'язування і визначає специфічність конкретного антитіла до свого конкретного антигена. У той самий час, варіабельність нерівномірно розподілена по всім варіабельним доменам. Замість цього, V-ділянки складаються з відносно інваріантних проміжків, що називаються каркасними ділянками (FR), з 15-30 амінокислот, які розділені короткими ділянками з надзвичайною варіабельністю, що називаються "гіперваріабельними ділянками", кожна з яких становить в довжину 9-12 амінокислот. Термін "гіперваріабельна ділянка" або "HVR", якщо використовується в цьому документі, належить до амінокислотних залишків антитіла, які відповідають за зв'язування антигена. Гіперваріабельна ділянка, як правило, містить амінокислотні залишки, наприклад, приблизно близько 24-34 (L1), 50-56 (L2) і 89-97 (L3) залишків у VL, і приблизно близько 26-35 (H1), 49-65 (H2) і 95-102 (H3) залишків в VH (в одному з варіантів здійснення H1 складається з приблизно близько 31-35 залишків); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) та/або цих залишки з "гіперваріабельної петлі" (наприклад, 26-32 (L1), 50-52 (L2) і 91-96 (L3) залишки в VL, і 26-32 (H1), 53-55 (H2), і 96-101 (H3) – в VH; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987). Кожен з варіабельних доменів нативних важких і легких ланцюгів містить чотири FR, переважно приймаючих конфігурацію бета-листу, що сполучені трьома гіперваріабельними ділянками, які утворюють петлі, що з'єднують структуру бета-листу, а в деяких випадках – утворюють частину структури бета-листу. Гіперваріабельні ділянки кожного ланцюга об'єднані один з одним безпосередньо поруч за допомогою FR і, разом з гіперваріабельними ділянками іншого ланцюга, беруть участь в утворенні антигензв'язуючого сайту (див. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Відповідно, послідовності HVR і FR, як правило, розташовуються в наступному порядку в VH (або VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. Константні домени не залучені безпосередньо до

зв'язування антитіла з антигеном, однак виявляють різні ефекторні функції, такі як участь антитіла в антитілозалежній клітинній токсичності (АЗКЦ).

Термін "нумерація амінокислотних залишків у варіабельному домені за Кабатом" або "нумерація положення амінокислоти за Кабатом" і їх варіації відносяться до системи нумерації, використовуваної для варіабельних доменів важкого ланцюга або варіабельних доменів легкого ланцюга, при компіляції антитіл за Kabat et al., вище. Для використання цієї системи нумерації, фактична лінійна амінокислотна послідовність може містити менше або більше амінокислот, що відповідає укороченню або вставкам у FR або HVR варіабельного домену. Наприклад, варіабельний домен важкого ланцюга може містити одиничну амінокислотну вставку (залишок 52a за Кабатом) після залишку 52 в H2 і вставлені амінокислотні залишки (наприклад, залишки 82a, 82b і 82c і т.д. за Кабатом) після FR амінокислотного залишку 82 важкого ланцюга. Нумерація залишків за Кабатом може бути визначена для цього антитіла шляхом вирівнювання гомологічних ділянок послідовності антитіла зі "стандартною" пронумерованою послідовністю за Кабатом.

Система нумерації за Кабатом, як правило, використовується при посиланні на амінокислотний залишок варіабельного домену (приблизно амінокислотні залишки 1-107 легкого ланцюга і амінокислотні залишки 1-113 важкого ланцюга) (наприклад, див. Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), який включений у цей документ за допомогою посилання в повному обсязі). "Система нумерації EU" або "індекс EU", як правило, використовується при посиланні на амінокислотний залишок у константній ділянці важкого ланцюга імуноглобуліну (наприклад, індекс EU представлений в Kabat et al., вище). "Індекс EU за Кабатом" відноситься до нумерації амінокислотних залишків антитіла людини IgG1 EU. Якщо не зазначено інше, посилання на номери залишків у варіабельному домені антитіла означає нумерацію залишків згідно з системою нумерації за Кабатом. Якщо не вказано інше, посилання на номери залишків у константній ділянці антитіла означає нумерацію залишків за системою нумерації EU, також званої індексом EU, як описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Якщо не вказано інше, залишки HVR і інші залишки у варіабельному домені (наприклад, залишки FR) нумеруються в цьому документі відповідно до Kabat et al., вище.

Термін "виділене антитіло", коли використовується для опису різних антитіл, описаних в цьому документі, відноситься до антитіла, яке ідентифіковано і відокремлено та/або виділено з клітини або культури клітин, в якій воно експресовано. Забруднюючі компоненти навколишнього природного середовища являють собою речовини, які, як правило, можуть заважати діагностичному або терапевтичному застосуванню поліпептиду, і можуть включати ферменти, гормони й інші білкові або небілкові розчинені речовини. У деяких варіантах здійснення антитіло є очищенням до більш ніж 95 % або 99 % чистоти, що визначається, наприклад, за допомогою електрофорезу (наприклад, електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (ДСН-ПААГ-електрофорез), ізоелектричного фокусування (ІЕФ), капілярного електрофорезу) або методу хроматографії (наприклад, іонообмінної або обернено-фазової ВЕРХ). Для огляду способів оцінки чистоти антитіл, див., наприклад, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007). У переважних варіантах здійснення антитіло буде очищено (1) до ступеню, достатнього для отримання щонайменше 15 залишків на N-кінцевій або внутрішній амінокислотній послідовності шляхом використання секвенатора з чашкою, яка обертається, або (2) до гомогенності, отриманої методом ДСН-ПААГ електрофорезу в невідновлюючих або відновлюючих умовах, за допомогою забарвлення барвником Кумасі синім або, переважно, сріблом. Виділене антитіло включає антитіла, які отримані in situ всередині рекомбінантних клітин, оскільки щонайменше один компонент із поліпептидного природного оточення буде відсутній. У той самий час, виділений поліпептид зазвичай буде отриманий з використанням щонайменше однієї стадії очищення.

Використаний в цьому документі термін "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, отриманого з популяції в значній мірі гомогенних антитіл, тобто, окремі антитіла, складові популяції, є ідентичними та/або зв'язують один епітоп за винятком можливих варіантних антитіл, наприклад, тих, що містять мутації природного походження або виникли під час отримання препарату моноклональних антитіл, при цьому такі варіанти в загальному випадку присутні в незначній кількості. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які зазвичай містять різні антитіла проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло з препарату моноклонального антитіла спрямоване проти однієї детермінанти антигена. Таким чином, визначення "моноклональний" вказує на характеристику антитіла, яке отримане по суті з однорідної популяції антитіл, і не повинно бути витлумачено як необхідність отримання антитіла

яким-небудь конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла для використання за цим винаходом можна отримати за допомогою різних способів, включно з, але не обмежуються ними, методом гібридомі, методами рекомбінантних ДНК, методами фагового дисплею і способами з використанням трансгенних тварин, що повністю або частково містять локуси людського імуноглобуліну, при цьому такі способи та інші ілюстративні способи отримання моноклональних антитіл описані в цьому документі.

Термін "мультиспецифічне антитіло" використовується в самому широкому сенсі і конкретно охоплює антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) і варіабельний домен легкого ланцюга (VL), причому одиниця VH-VL має поліепітопну специфічність (тобто здатна зв'язуватися з двома різними епітопами на одній біологічній молекулі або з кожним епітопом на різних біологічних молекулах). Такі мультиспецифічні антитіла включають, але не обмежуються ними, повнорозмірні антитіла, антитіла, що мають два або більше доменів VL і VH, фрагменти антитіл, такими як Fab, Fab', Fab-C, Fv, dsFv, scFv, діатіла, біспецифічні діатіла і триатіла, фрагменти антитіла, які ковалентно або нековалентно зв'язані. "Поліепітопна специфічність" припускає здатність специфічно зв'язуватися з двома або більше різними епітопами на одній і тій самій або різних мішенях(i). "Подвійна специфічність" або "біспецифічність" відноситься до здатності специфічно зв'язуватися з двома різними епітопами на одній і тій самій або різних мішенях(i). Однак, на відміну від біспецифічних антитіл, антитіла з подвійною специфічністю мають два антигензв'язуючих плеча, які ідентичні амінокислотній послідовності і кожне Fab-плече здатне розпізнавати два антигени. Подвійна специфічність дає можливість антитілам взаємодіяти з високою афінністю з двома різними антигенами як одна молекула Fab або IgG. Згідно з одним з варіантів здійснення мультиспецифічне антитіло у вигляді IgG1 зв'язуються з кожним епітопом з афінністю від 5 мкМ до 0,001 пМ, від 3 мкМ до 0,001 пМ, від 1 мкМ до 0,001 пМ, від 0,5 мкМ до 0,001 пМ або від 0,1 мкМ до 0,001 пМ. Термін "моносспецифічний" відноситься до здатності зв'язувати тільки один епітоп.

Термін "нативні антитіла" відноситься до природних молекул імуноглобулінів, які мають різні структури. Наприклад, нативні антитіла IgG являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни з молекулярної масою близько 150000 дальтон, що складаються з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів, з'єднаних дисульфідними зв'язками. У напрямку від N- до C-кінця кожен важкий ланцюг має варіабельну ділянку (VH), яку також називають варіабельним важким доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, за яким слідує три константні домени (CH1, CH2 і CH3). Аналогічним чином в напрямку від N- до C-кінця кожен легкий ланцюг має варіабельну ділянку (VL), яка також називається варіабельним легким доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, за яким слідує константний домен легкого ланцюга (CL). Залежно від амінокислотної послідовності свого константного домену легкий ланцюг антитіла можна віднести до одного з двох типів, які називаються каппа (κ) і лямбда (λ).

Стосовно до зв'язування антитіла з молекулою-мішенню, термін "специфічне зв'язування" або "специфічно зв'язуватися з" або є "специфічним до" конкретного поліпептиду або епітопа на конкретній поліпептидній мішені означає зв'язування, яке вимірювано відрізняється від неспецифічної взаємодії. Специфічне зв'язування може бути виміряно, наприклад, за допомогою визначення зв'язування молекули порівняно зі зв'язуванням контрольної молекули. Наприклад, специфічне зв'язування може визначатися конкуренцією з відповідною молекулою, яка схожа з мішенню, наприклад, з надлишком неміченої мішені. У цьому випадку специфічне зв'язування демонструє чи може зв'язування міченої мішені із зондом повністю інгібуватися надлишком неміченої мішені. Термін "специфічне зв'язування" або "специфічно зв'язується з" або є "специфічним до" конкретного поліпептиду або епітопа на конкретній поліпептидній мішені, як використовується в цьому документі, може бути проілюстрований, наприклад, за допомогою молекули, що має Kd для мішені 10^{-4} М або нижче, альтернативно 10^{-5} М або нижче, альтернативно 10^{-6} М або нижче, альтернативно 10^{-7} М або нижче, альтернативно 10^{-8} М або нижче, альтернативно 10^{-9} М або нижче, альтернативно 10^{-10} М або нижче, альтернативно 10^{-11} М або нижче, альтернативно 10^{-12} М або нижче, або Kd у діапазоні від 10^{-4} М до 10^{-6} М, або від 10^{-6} М до 10^{-10} М, або від 10^{-7} М до 10^{-9} М. Як буде зрозуміло фахівцю в цій галузі техніки, значення афінності та Kd пов'язані зворотною залежністю. Висока афінність для антигена вимірюється низьким значенням Kd. В одному варіанті здійснення термін "специфічне зв'язування" відноситься до зв'язування, при якому молекула зв'язується з конкретним поліпептидом або епітопом на конкретному поліпептиді без значного зв'язування з будь-яким іншим поліпептидом або поліпептидним епітопом.

Фраза "нуклеїнова кислота, що кодує анти-ФРЕС антитіло" відноситься до однієї або більше молекул нуклеїнових кислот, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла (або їх фрагменти),

включно з молекулами нуклеїнових(ої) кислот(и), які присутні в одному векторі або окремих векторах, і молекулами нуклеїнових(ої) кислот(и), які присутні в одному або більше місцях в клітині-хазяїні.

Термін "вектор" в контексті цього документа відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка здатна забезпечувати репродукцію іншої нуклеїнової кислоти, яка зв'язана з нею. Термін включає вектор як структуру нуклеїнової кислоти, що самореplikується, а також вектор, який включений у геном клітини-хазяїна, в яку він був введений. Деякі вектори здатні направляти експресію нуклеїнових кислот, з якими вони функціонально пов'язані. Такі вектори в цьому документі називають "векторами експресії".

Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїв" і "культура клітин-хазяїв" використовуються як взаємозамінні і відносяться до клітин, в які введена екзогенна нуклеїнова кислота, включно з потомством таких клітин. Клітини-хазяї включають "трансформантів" і "трансформовані клітини", які включають первинно трансформовані клітини і отримане від них потомство, незалежно від кількості пасажів. Потомство може не бути повністю ідентичним вихідній клітині за вмістом нуклеїнових кислот, і може містити мутації. У цей документ включено мутантне потомство, яке має таку саму функцію або біологічну активність, яка є предметом досліджень або відбору у трансформованій клітині.

"Відсоток (%) ідентичності амінокислотних послідовностей" по відношенню до контрольної поліпептидної послідовності визначається як процентна частка амінокислотних залишків у кандидатній послідовності, які є ідентичними з амінокислотними залишками в еталонній поліпептидній послідовності, після вирівнювання послідовностей і внесення, у разі потреби, гепів для досягнення максимальної ідентичності послідовностей, але без урахування будь-яких консервативних замін як частини ідентичності послідовностей. Вирівнювання з метою визначення відсотка ідентичності амінокислотних послідовностей може здійснюватися різними способами, які відомі фахівцям у цій галузі техніки, наприклад, з використанням загальнодоступних комп'ютерних програм, таких як програмні забезпечення BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівці в цій галузі можуть визначити параметри, які підходять для вирівнювання послідовностей, зокрема будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання порівнюваних послідовностей по всій довжині. Однак для цілей цього винаходу значення % ідентичності амінокислотних послідовностей генеруються з використанням комп'ютерної програми порівняння послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма для вирівнювання послідовностей ALIGN-2 була розроблена Genentech, Inc., а вихідна програма була подана разом з документацією користувача в Бюро реєстрації авторських прав США, Вашингтон, округ Колумбія, 20559, де вона зареєстрована під номером реєстрації авторського права США TXU510087. Програма ALIGN-2 знаходиться у вільному доступі в Genentech, Inc., Південний Сан-Франциско, штат Каліфорнія, або її можна скопіювати з вихідного коду. Для застосування в операційній системі UNIX, що включає цифрову версію UNIX V4.0D, програму ALIGN-2 потрібно скопіювати. Всі параметри порівняння послідовностей встановлюються програмою ALIGN-2 і залишаються незмінними.

У тих випадках, коли для порівняння амінокислотних послідовностей використовується ALIGN-2, % ідентичності амінокислотної послідовності цієї амінокислотної послідовності А до, з, або по відношенню до цієї амінокислотної послідовності В (що в альтернативному варіанті може бути сформульоване як ця амінокислотна послідовність А, яка має або містить певний % ідентичності амінокислотної послідовності до, з, або по відношенню до цієї амінокислотної послідовності В) розраховують наступним чином: 100 помножити на співвідношення X/Y, де X являє собою число амінокислотних залишків, які оцінювались програмою вирівнювання послідовностей ALIGN-2 як ідентичні співпадіння при програмному вирівнюванні А і В, і де Y являє собою загальну кількість амінокислотних залишків в В. Слід розуміти, що, довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності В, % ідентичності амінокислотних послідовностей А до В не дорівнює % ідентичності амінокислотних послідовностей В до А. Якщо спеціально не вказано інше, всі значення % ідентичності амінокислотних послідовностей, які використовується в цьому документі, отримують, як описано в попередньому абзаці з використанням комп'ютерної програми ALIGN-2.

Термін "введення", використовуваний в цьому документі, означає спосіб введення суб'єкту дози сполуки (наприклад, антитіла (наприклад, анти-ФРЕС антитіла, сконструйованого введенням цистеїну), або кон'югату антитіла (наприклад, монодисперсного кон'югату ГК) за цим винаходом) або композиції (наприклад, фармацевтичної композиції, наприклад, фармацевтичної композиції, що містить антитіло або кон'югат антитіла за винаходом). Композиції, які застосовуються в описаних в цьому документі способах, можна вводити, наприклад, інтравітреально (наприклад, шляхом ін'єкції в склоподібне тіло), у вигляді очних

крапель, внутрішньом'язово, внутрішньовенно, інтрадермально, чрезшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньочеревно, внутрішньовогнищево, інтракраніально, внутрішньосуглобово, внутрішньопростатно, внутрішньоплеврально, інтратрахеально, інтратекально, інтраназально, вагінально, ректально, місцево, внутрішньопухлинно, внутрішньочеревно, підшкірно, субкон'юнктивально, внутрішньопузырно, через слизову оболонку, інтраперикардіально, внутрішньопуповинно, інтраокулярно, інтраорбітально, перорально, місцево, трансдермально, шляхом інгаляції, шляхом ін'єкції, шляхом імплантації, шляхом інфузії, шляхом безперервної інфузії, шляхом локалізованої перфузії безпосередньо через клітини-мішені, за допомогою катетера, за допомогою лаважу, у кремах або в ліпідних композиціях. Композиції, які використовуються в способах, що описані в цьому документі, можна також вводити системно або локально. Спосіб введення може змінюватися в залежності від різних факторів (наприклад, сполуки або композиції для введення, ступеня тяжкості патологічного стану, захворювання або порушення, що підлягає лікуванню).

"Ангіогенез" відноситься до процесу, за допомогою якого з раніше існуючих кровоносних судин утворюються нові кровоносні судини. Ангіогенез відрізняється від васкулогенезу, який являє собою утворення ендотеліальних клітин *de novo* з мезодермальних клітин-попередників. Захворювання, пов'язані з патологічним ангіогенезом можна лікувати за допомогою композицій і способів за винаходом. Приклади порушень, пов'язаних з патологічним ангіогенезом, включають, але не обмежуються ними, хвороби очей (необмежуючі хвороби очей включають, наприклад, ретинопатії, зокрема проліферативну діабетичну ретинопатію, хоріоїдальну неоваскуляризацію (ХНВ), вікову макулярну дегенерацію (ВМД), діабетичну та інші ретинопатії, пов'язані з ішемією, діабетичний макулярний набряк (ДМН), патологічну міопію, хворобу Гіппеля-Ліндау, гістоплазмоз очей, оклюзію вен сітківки (зокрема форми оклюзії центральної вени сітківки (ОЦВС) і гілки центральної вени сітківки (ОГВС)), неоваскуляризацію рогівки, неоваскуляризацію сітківки, ретинопатію недоношених (РН), сімейну ексудативну вітреоретинопатію (СЕВ), хворобу Коутса, хворобу Норрі, синдром остеопорозу-псевдогліоми (OPPG), субкон'юнктивальний крововилив, рубеоз, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярну глаукому, гіпертонічну ретинопатію). Додаткові захворювання очей описані нижче.

Термін "захворювання очей", використовуваний в цьому документі, включає будь-яке захворювання очей (також зване в цьому документі взаємозамінно як "патологічний стан очей"), пов'язане з патологічним ангіогенезом. Захворювання очей може характеризуватися зміненою або нерегульованою проліферацією та/або інвазією нових кровоносних судин у структури очних тканин, такі як сітківка або рогівка. Необмежуючі хвороби очей включають, наприклад, ВМД (наприклад, вологу форму ВМД, суху форму ВМД, ВМД на проміжній стадії, ВМД на пізній стадії, і географічну атрофію сітківки (ГА)), макулярну дегенерацію, макулярний набряк, ДМН (наприклад, фокальний нецентральный ДМН і дифузний центральный ДМН), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (ДР) (наприклад, проліферативну ДР (ПДР), непроліферативну ДР (НПДР), і високогірну ДР), інші ретинопатії, пов'язані з ішемією, РН, оклюзію вен сітківки (ОВС) (наприклад, форми оклюзії центральної вени сітківки (ОЦВС) і гілки центральної вени сітківки (ОГВС)), ХНВ (наприклад, міопічну ХНВ), неоваскуляризацію рогівки, хвороби, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, хвороби, пов'язані з неоваскуляризацією сітківки / хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічну міопію, хворобу Гіппеля-Ліндау, гістоплазмоз очей, СЕВ, хворобу Коутса, хворобу Норрі, OPPG, субкон'юнктивальний крововилив, рубеоз, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярну глаукому пігментний ретиніт (ПР), гіпертонічну ретинопатію, ретинальну ангіоматозну проліферацію, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію райдужки, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, кістозний макулярний набряк (КМН), васкуліт, набряк диска зорового нерва, ретиніт, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний та неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт), вроджений амавроз Лебера (також відомий як амавроз Лебера або ВАЛ), увеїт (зокрема інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, мультифокальний хоріоїдит), гістоплазмоз очей, блефарит, синдром сухого ока, травматичне пошкодження очей, синдром Шегрена, і інші хвороби очей, причому захворювання або порушення пов'язане з неоваскуляризацією, транссудацією та/або набряком сітківки. Додаткові ілюстративні хвороби очей включають хвороби, пов'язані з рубеозом (неоваскуляризацією кута передньої камери), і хвороби, викликані аномальною проліферацією фіброваскулярної або фіброзної тканини, зокрема всіх форм проліферативної вітреоретинопатії.

Приклади захворювань, пов'язаних з неоваскуляризацією рогівки, включають, але не обмежуються ними, епідемічний кератокон'юнктивіт, дефіцит вітаміну А, синдром переносування контактних лінз, атопічний кератит, верхній лімбальний кератит, птеригіум,

сухий кератит, синдром Шегрена, рожеві вугри, фліктенулезний кон'юнктивіт, сифіліс, інфекції, викликані *Mycobacteria*, ліпідну дегенерацію, хімічні опіки, бактеріальну виразку, грибову виразку, інфекції, викликані простим герпесом, оперізуючий лишай, протозойні інфекції, саркому Капоші, виразку Мурена, крайову дегенерацію Террієна, крайової кератоліз, ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, поліартрит, травму, саркоїдоз Вегенера, склерит, синдром Стівенса-Джонсона, радіальну кератотомію при пемфігоїді, що рубцюється, і відторгнення трансплантата рогівки.

Приклади захворювань, пов'язаних з неоваскуляризацією сітківки / хоріоїдальною неоваскуляризацією, включають, але не обмежуються ними, діабетичну ретинопатію, макулярну дегенерацію, серповидно-клітинну анемію, саркоїдоз, сифіліс, еластичну псевдоксантому, хворобу Педжета, оклюзію вени, оклюзію артерії, атеросклероз сонних артерій, хронічний увеїт/вітреїт, мікобактеріальні інфекції, хворобу Лайма, системний червоний вовчак, ретинопатію недоношених, пігментний ретиніт, набряк сітківки (зокрема макулярний набряк), захворювання Ілза, хворобу Бехчета, інфекції, що викликає ретиніт або хоріоїдит (наприклад, мультифокальний хоріоїдит), синдром передбачуваного гістоплазмозу очей, хворобу Беста (врожену дегенерацію жовтої плями), короткозорість, вроджені ямки в диску зорового нерва, хворобу Штаргардта, парспланіт, відшарування сітківки (наприклад, хронічне відшарування сітківки), синдроми підвищеної в'язкості крові, токсоплазмоз, травми, і постлазерні ускладнення.

"Ангіогенний фактор або агент" являє собою фактор росту, який стимулює розвиток кровоносних судин, наприклад, стимулює ангиогенез, ріст ендотеліальних клітин, стабільність кровоносних судин і/або васкулогенез і т. д. Наприклад, ангиогенні фактори, включають, але не обмежуються цим, наприклад, ФРЕС і члени сімейства ФРЕС, PIGF (плацентарний фактор росту), сімейства ТцФР, сімейства факторів росту фібробластів (ФРФ), ліганди TIE (ангіопоетини), ефрини, Del-1, фактори росту фібробластів: кислотний (кФРФ) і основний (оФРФ), фоллістатин, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (Г-КСФ), фактор росту гепатоцитів (ФРН)/розсіючий фактор (РФ), інтерлейкін-8 (ІЛ-8), лептин, мідкін, фактор росту плаценти, тромбоцитарний фактор росту ендотеліальних клітин (PD-ECGF), тромбоцитарний фактор росту, особливо PDGF-BB або PDGFR-бета, плейотропін (ПТН), програнулін, проліферин, трансформуючий фактор росту-альфа (ТФР-альфа), трансформуючий фактор росту-бета (ТФР-бета), фактор некрозу пухлини-альфа (ФНП-альфа), фактор росту ендотелію судин (ФРЕС)/фактор судинної проникності (VPF) і т. д. Вони також включають фактори, що прискорюють загоєння ран, такі як гормон росту, інсуліноподібний фактор росту I (IGF-I), VIGF, епідермальний фактор росту (ЕФР), CTGF (фактор росту сполучної тканини) і члени його родини, а також ТФР-альфа і ТФР-бета. Див., наприклад, Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (наприклад, у Таблиці 1 перераховані відомі ангиогенні фактори); і Sato, *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003).

"Антиангіогенний агент" або "інгібітор ангиогенезу" відноситься до речовини з малою молекулярною масою, поліпептиду, поліпептиду, виділеного білка, рекомбінантного білка, антитіла, або кон'югатів або їх злитих білків, які інгібують ангиогенез, васкулогенез або небажану проникність судин або безпосередньо або опосередковано. Слід розуміти, що антиангіогенний агент включає такі агенти, які зв'язують і блокують ангиогенну активність ангиогенного фактора або його рецептора. Наприклад, антиангіогенний агент являє собою антитіло або інший антагоніст ангиогенного агента, як визначено вище, наприклад, антагоністи ФРЕС (наприклад, антитіло до ФРЕС-А або до рецептора ФРЕС-А (наприклад, до рецептора KDR або рецептора Flt-1)), антагоністи ТцФР (наприклад, анти-ТцФР інгібітори, такі як GLEEVECTM (імаїнібу мезилат)). Антиангіогенні агенти також включають нативні інгібітори ангиогенезу, наприклад, ангиостатин, ендостатин і т. д. Див., наприклад, Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (наприклад, у Таблиці 3 перераховані антиангіогенні терапії при злоякісній меланомі); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (наприклад, у Таблиці 2 перераховані відомі антиангіогенні фактори); і, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (наприклад, у Таблиці 1 перераховані антиангіогенні агенти, використовувані в клінічних випробуваннях).

Термін "антагоніст ФРЕС", що використовується в цьому документі, відноситься до молекули, здатної зв'язуватися з ФРЕС, знижуючи рівні експресії ФРЕС або нейтралізуючи, блокуючи, інгібуючи, пригнічуючи, зменшуючи або перешкоджаючи біологічній активності ФРЕС, зокрема, але не обмежуються ними, зв'язування ФРЕС з одним або більше рецепторами ФРЕС, сигналінг ФРЕС та ФРЕС-опосередкований ангиогенез і виживання або проліферацію ендотеліальних клітин. Наприклад, молекула, яка здатна нейтралізувати, блокувати, інгібувати,

пригнічувати, зменшувати або перешкоджати біологічній активності ФРЕС, може проявляти свої ефекти шляхом зв'язування з одним або більше рецепторами ФРЕС (ФРЕСР) (наприклад, ФРЕСР1, ФРЕСР2, ФРЕСР3, мембранозв'язаним рецептором ФРЕС (мзФРЕСР) або розчинним рецептором ФРЕС (рФРЕСР)). Антагоністами ФРЕС, використовуваними в способах за цим винаходом, можна назвати поліпептиди, які специфічно зв'язуються з ФРЕС, анти-ФРЕС антитіла та їх антигензв'язуючі фрагменти, молекули рецепторів і їх похідні, які специфічно зв'язуються з ФРЕС, тим самим запобігаючи його зв'язуванню з одним або більше рецепторами, злитими білками (наприклад, VEGF-Trap (Regeneron)), і ФРЕС₁₂₁-гелонін (Peregrine). Антагоністи ФРЕС, також включають антагоністичні варіанти поліпептидів ФРЕС, антисенсові нуклеотидні олігомери, комплементарні щонайменше одному фрагменту молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид ФРЕС; малі РНК, комплементарні щонайменше одному фрагменту молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид ФРЕС; рибозими, націлені на ФРЕС; пептитіла (pertibodies) до ФРЕС; та аптамери ФРЕС. Антагоністи ФРЕС також включають поліпептиди, які зв'язуються з ФРЕСР, анти-ФРЕСР антитіла і їх антигензв'язуючі фрагменти і похідні, які зв'язуються з ФРЕСР, таким чином, що блокують, інгібують, пригнічують, зменшують або перешкоджають біологічній активності ФРЕС (наприклад, сигналіngu ФРЕС), злиті білки. Антагоністи ФРЕС, також включають непептидні малі молекули, що зв'язуються з ФРЕС або ФРЕСР, і здатні блокувати, інгібувати, пригнічувати, зменшувати або перешкоджати біологічній активності ФРЕС. Таким чином, термін "активність ФРЕС", зокрема, включає ФРЕС-опосередковану біологічну активність ФРЕС. У деяких варіантах здійснення антагоніст ФРЕС зменшує або інгібує щонайменше на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більш рівень експресії або біологічної активності ФРЕС. У деяких варіантах здійснення ФРЕС інгібується ФРЕС-специфічним антагоністом, який являє собою ФРЕС(8-109), ФРЕС(1-109) або ФРЕС₁₆₅.

Антагоністи ФРЕС, які використовуються в цьому документі, можуть включати, але не обмежуються ними, анти-ФРЕСР2 антитіла та споріднені молекули (наприклад, рамуцирумаб, танібірумаб, афліберсепт), анти-ФРЕСР1 антитіла та споріднені молекули (наприклад, ікрукумаб, афліберсепт (VEGF Trap-Eye; EYLEA®), і зів-афліберсепт (VEGF Trap; ZALTRAP®)), біспецифічні антитіла до ФРЕС (наприклад, MP-0250, вануцизумаб (VEGF-ANG2), і біспецифічні антитіла, описані в US 2001/0236388), біспецифічні антитіла, які включають комбінації двох анти-ФРЕС, анти-ФРЕСР1, і анти-ФРЕСР2 плечей, анти-ФРЕС антитіла (наприклад, бевацизумаб, севацизумаб і ранібізумаб), і непептидні низькомолекулярні антагоністи ФРЕС (наприклад, пазопаніб, акситиніб, вандетаниб, стіварга, кабозанініб, ленватиніб, ніндеданіб, орантиніб, телатиніб, довітиніг, сидираніб, мотосаніб, сульфатиніб, апатиніб, форатиніб, фамітиніб, і тивозаніб). Додаткові антагоністи ФРЕС описані нижче.

"Ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичного препарату, відноситься до кількості, ефективного в дозах та протягом необхідних періодів часу, для досягнення необхідного терапевтичного або профілактичного результату.

"Індивідуум" або "суб'єкт" являє собою ссавця. Ссавці включають, але не обмежуються цими, одомашнених тварин (наприклад, корів, овець, кішок, собак, коней), приматів (наприклад, людей та приматів, відмінних від людини, таких, як мавпи), кроликів і гризунів (наприклад, мишей та щурів). У деяких варіантах здійснення індивідуум або суб'єкт являє собою людину. "Суб'єкт" може бути "пацієнтом".

"Порушення" являє собою будь-який патологічний стан, що піддається лікуванню за допомогою антитіл. Так, наприклад, ссавці, які страждають від або потребують профілактики проти аномального ангиогенезу (надмірного, невідповідного або неконтрольованого ангиогенезу). Цей термін охоплює хронічні та гострі порушення або захворювання, зокрема ті патологічні стани, які збільшують схильність ссавця до цього порушення. У цьому документі необмежуючі приклади порушень, що підлягають лікуванню, включають порушення, пов'язані з патологічним ангиогенезом (наприклад, хвороби очей).

Термін "листок-вкладиш в упаковці" використовується для позначення інструкцій, які зазвичай вкладають в комерційні упаковки терапевтичних продуктів для продажу, що містять інформацію про показання, використання, дозування, прийом комбінованої терапії, протипоказання та/або застереження, що стосуються використання таких терапевтичних продуктів.

Термін "фармацевтично прийнятний носій" відноситься до інгредієнта у фармацевтичній композиції, відмінному від активного інгредієнта, який є нетоксичним для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає, але не обмежуються ними, буфер, допоміжну речовину, стабілізатор або консервант.

Термін "фармацевтичний препарат" відноситься до препарату, який знаходиться у такій

формі, щоб забезпечити біологічну активність активного інгредієнта (наприклад, кон'югату антитіла), що міститься в ньому, щоб бути ефективним, і який не містить яких-небудь додаткових компонентів, які є неприйнятно токсичними для суб'єкта, якому буде вводиться склад.

У цьому документі термін "лікування" (і його граматичні варіанти, наприклад, "лікувати") відноситься до клінічного втручання при спробі змінити природний хід захворювання у індивідуума, що піддається лікуванню, і може здійснюватися для профілактики або в процесі клінічного прояву патології. Бажані ефекти лікування включають, але не обмежуються ними, запобігання виникнення або рецидиву захворювання, часткове зняття симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, зниження швидкості прогресування захворювання, поліпшення або тимчасове полегшення патологічного стану, і ремісію або поліпшення прогнозу. У деяких варіантах здійснення кон'югати антитіла за винаходом або інші композиції, які містять кон'югат антитіла за винаходом, (наприклад, фармацевтичний препарат) використовуються для затримки розвитку захворювання або уповільнення прогресування.

"Виділена" молекула нуклеїнової кислоти являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, яка ідентифікована і відокремлена, щонайменше від однієї забруднюючої молекули нуклеїнової кислоти, з якою вона зазвичай пов'язана у природному джерелі нуклеїнової кислоти. Виділена молекула нуклеїнової кислоти відрізняється від форми або стану, в якому вона знаходиться в природі. Тому виділені молекули нуклеїнової кислоти відрізняються від молекули нуклеїнової кислоти, що знаходиться в природних клітинах. Однак виділена молекула нуклеїнової кислоти містить молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які зазвичай експресують антитіло, де, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти присутня в області хромосоми, що відрізняється від її положення в природних клітинах.

Термін "контрольні послідовності" відноситься до послідовностей ДНК, які необхідні для експресії функціонально пов'язаної кодуєчої послідовності в конкретному організмі-хазяїні. Контрольні послідовності, які підходять для прокариотів, наприклад, включають промотор, необов'язково послідовність оператора і сайт зв'язування рибосом. Відомо, що в клітині використовуються промотори, сигнали поліаденілювання та енхансери.

Нуклеїнова кислота є "функціонально пов'язаною", коли вона поміщена у функціональну залежність від іншої послідовності нуклеїнової кислоти. Наприклад, ДНК передпослідовності або секреторного лідера є функціонально пов'язаною з ДНК поліпептиду, якщо вона експресується як білок-попередник, бере участь у секреції цього поліпептиду; промотор або енхансер функціонально пов'язаний з кодуєчою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію цієї послідовності, або сайт зв'язування рибосом функціонально пов'язаний з кодуєчою послідовністю, якщо він розташований так, щоб полегшувати проходження трансляції. У цілому, "функціонально пов'язаний" означає, що послідовності ДНК, будучи зв'язаними, є безперервними і, в разі наявності секреторного лідера, безперервними і у фазі зчитування. Тим не менш, енхансери не повинні бути безперервними. Зв'язування супроводжується лігуванням за відповідними сайтами рестрикції. Якщо таких сайтів немає, то згідно з відповідною методикою використовуються синтетичні олігонуклеотидні адаптори або лінкери.

Як використовується в цьому документі, фрази "клітина", "лінія клітин" і "культура клітин" використовується взаємозамінно, і всі такі позначення включають потомство. Таким чином, слова "трансформанти" і "трансформовані клітини" включають первинну клітину суб'єкта і культури, отримані з неї, без урахування числа пасажів. Слід також розуміти, що все потомство може не бути повністю ідентичним за вмістом ДНК внаслідок навмисних або випадкових мутацій. Включено мутантне потомство, яке має таку саму функцію або біологічну активність, яка є предметом досліджень у трансформованій клітині. З контексту буде ясно де включаються різні позначення.

"Варіант" або "мутант" з вихідного або еталонного поліпептиду (наприклад, еталонне антитіло або його варіабельний домен(и)/HVR) являє собою поліпептид, який (1) має амінокислотну послідовність, відмінну від вихідного або еталонного поліпептиду і (2) був отриманий з вихідного або еталонного поліпептиду шляхом або природного чи штучного (зробленого людиною) мутагенезу. Такі варіанти включають, наприклад, делеції з, і/або вставки в, і/або заміни залишків в амінокислотній послідовності поліпептиду, що являє інтерес, які називаються в цьому документі як "зміни амінокислотних залишків". Таким чином, варіант HVR відноситься до HVR, що містить послідовність варіанта по відношенню до вихідної або еталонної поліпептидної послідовності (наприклад, як у вихідного антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента). Зміна амінокислотного залишку, в цьому контексті, належить до амінокислоти, відмінної від амінокислоти у відповідній позиції у вихідній або еталонній

послідовності поліпептиду (наприклад, як у еталонного антитіла або його фрагмента). Будь-яка комбінація делецій, вставок та заміни може бути зроблена, щоб досягти кінцевого варіанту або мутантного конструкта, за умови, що кінцевий конструкт має бажані функціональні характеристики. Зміни амінокислот також можуть змінювати посттрансляційні процеси

поліпептиду, такі як зміна кількості або положення сайтів глікозилювання.

Послідовність "дикого типу (ДТ)", або "еталонна" послідовність, або послідовність білка/поліпептиду "дикого типу", або "еталонного" білка/поліпептиду, такі як HVR або варіабельний домен еталонного антитіла, можуть представляти собою еталонну послідовність, з якої шляхом введення мутації отримують варіантні поліпептиди. Загалом, послідовність "дикого типу" для цього білка являє собою послідовність, яка є найбільш поширеною в природі. Подібним чином, послідовність гена "дикого типу" являє собою послідовність для цього гена, який найбільш часто зустрічається в природі. Мутації можуть бути введені в ген "дикого типу" (і, таким чином, він кодує білок) або шляхом природних процесів або за допомогою технічних засобів. Продуктами таких процесів є "варіантні" або "мутантні форми вихідного білка або гена

"дикого типу". Термін "ізоелектрична точка (pI)" означає, рН, за яким молекула (наприклад, білок, такий як антитіло) не несе ніякого чистого електричного заряду, також званого в цій галузі техніки як "pH(I)" або "IEP".

Як використовується в цьому документі термін "кон'югат антитіла" являє собою антитіло, ковалентно приєднане до одного або більше полімерів. Будь-який полімер може бути кон'югований з антитілом, наприклад, гідрофільний полімер (наприклад, гіалуронова кислота (ГК) або поліетиленгліколь (ПЕГ)) або гідрофобний полімер (наприклад, полілактид-ко-гліколід (PLGA)). У конкретних варіантах здійснення полімер являє собою ГК (також звану в цьому документі як "кон'югати ГК").

Як використовується в цьому документі термін "полімер" означає молекулу, яка містить повторювані структурні одиниці (тобто мономер), з'єднані хімічними зв'язками лінійним, кільцевим, розгалуженим, поперечно-зшитим або дендримерним чином, або їх комбінацією. Полімер може бути синтетичним або природним, або їх комбінацією. Слід розуміти, що термін "полімер" включає кополімери, які являють собою полімери, які містять два або більше різних мономерів. Полімер також може являти собою гомополімер, який являє собою полімер, який містить тільки один тип мономера.

Термін "індекс полідисперсності (PDI)" відноситься до вимірювання широти молекулярно-масового розподілу полімеру. PDI також згадується в цій галузі техніки як "індекс дисперсності", "показник полідисперсності", або "ступінь дисперсності (Đ)". PDI зразка полімеру може бути розрахований з використанням рівняння (I): $\bar{M}_w = \bar{M}_w / \bar{M}_n$, де $\bar{M}_w$ являє собою середньомасову молекулярну масу і $\bar{M}_n$ являє собою середньочисельну молекулярну масу. Якщо не вказано інше, PDI розраховується відповідно до рівняння (i).

Зразок полімеру можна вважати "монодисперсним" (також відомий в цій галузі техніки як однорідний) або "полідисперсним" (також відомий в цій галузі техніки як неоднорідний). Як використано в цьому описі, термін "монодисперсний" по відношенню до зразка полімеру ГК або кон'югату ГК означає, що зразок полімеру ГК або кон'югат ГК зразка має PDI менше ніж або рівний близько 1,1, наприклад, близько 1,001, близько 1,02, близько 1,03, близько 1,04, близько 1,05, близько 1,06, близько 1,07, близько 1,08, близько 1,09, або близько 1,1. Наприклад, зразок монодисперсного полімеру ГК або кон'югату ГК може мати PDI від 1,0 до близько 1,1 (наприклад, від 1 до близько 1,1, від 1 до близько 1,09, від 1 до близько 1,08, від 1 до близько 1,07, від 1 до близько 1,06, від 1 до близько 1,05, від 1 до близько 1,04, від 1 до близько 1,03, від 1 до близько 1,02, від 1 до близько 1,01, від 1 до близько 1,005, від близько 1,001 до близько 1,1, від близько 1,001 до близько 1,09, від близько 1,001 до близько 1,08, від близько 1,001 до близько 1,07, від близько 1,001 до близько 1,06, від близько 1,001 до близько 1,05, від близько 1,001 до близько 1,04, від близько 1,001 до близько 1,03, від близько 1,001 до близько 1,02, від близько 1,001 до близько 1,01, від близько 1,001 до близько 1,005, від близько 1,001 до близько 1,004, від близько 1,001 до близько 1,003, від близько 1,001 до близько 1,002, від близько 1,0001 до близько 1,1, від близько 1,0001 до близько 1,09, від близько 1,0001 до близько 1,08, від близько 1,0001 до близько 1,07, від близько 1,0001 до близько 1,06, від близько 1,0001 до близько 1,05, від близько 1,0001 до близько 1,04, від близько 1,0001 до близько 1,03, від близько 1,0001 до близько 1,02, від близько 1,0001 до близько 1,01, від близько 1,0001 до близько 1,005, від близько 1,0001 до близько 1,004, від близько 1,0001 до близько 1,003, від близько 1,0001 до близько 1,002, або від близько 1,0001 до близько 1,005).

На противагу цьому термін "полідисперсний" означає, що зразок полімеру ГК або кон'югату

ГК має PDI більше ніж 1,1, наприклад, близько 1,3, близько 1,4, близько 1,5, близько 1,6, близько 1,7, близько 1,8 або вище. Наприклад, у деяких варіантах здійснення полідисперсний зразок полімеру ГК або кон'югату ГК має PDI в діапазоні від близько 1,3 до близько 2, від близько 1,4 до близько 2, від близько 1,5 до близько 2, від близько 1,6 до близько 2, від близько 1,7 до близько 2, від близько 1,8 до близько 2, або від близько 1,9 до близько 2.

Терміни "гіалуронова кислота", "гіалуронан" і "ГК", які використовуються в цьому документі взаємозамінно, належать до полімерного глікозаміноглікану (ГАГ), який містить повторювані дисахаридні одиниці N-ацетилглюкозаміну та глюкуронової кислоти. ЦК являє собою аніонний, нессульфатовані ГАГ, які можна знайти, наприклад, у позаклітинному матриксі (наприклад, у склоподібному тілі ока), сполучній тканині, епітеліальній та нервовій тканині.

Термін "поліетиленгліколь" або "ПЕГ", який використовується в цьому документі, відноситься до поліефірної сполуки, яка також відома як поліетиленоксид (ПЕО) або поліоксиетилен (ПОЕ), в залежності від її молекулярної маси. ПЕГ може мати структуру $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$, де n являє собою будь-яке відповідне ціле число. ПЕГ може являти собою розгалужений ПЕГ, зіркоподібний ПЕГ, або гребенеподібний ПЕГ. ПЕГ може являти собою, наприклад, тетрамер ПЕГ, гексамер ПЕГ, або октамер ПЕГ.

Термін "кліренс", що використовується в цьому документі, відноситься до об'єму речовини (наприклад, анти-ФРЕС антитіла, кон'югату антитіла, злитого білка (наприклад, Fab-злитого білка), або полімерного препарату), який виводиться з компартмента (наприклад, очі (наприклад, склоподібного тіла)) в одиницю часу.

Термін "період напіввиведення" відноситься до часу, необхідного для зменшення наполовину концентрації речовини (наприклад, анти-ФРЕС антитіла, кон'югату антитіла, злитого білка (наприклад, Fab-злитого білка), або полімерного препарату), in vivo (наприклад, в оці (наприклад, склоподібному тілі)) або in vitro.

II. КОМПОЗИЦІЇ ТА СПОСОБИ

Винахід забезпечує кон'югати антитіл, які містять полімери (наприклад, монодисперсні полімери ГК), ковалентно зв'язані з антитілами (наприклад, анти-ФРЕС антитілами, зокрема анти-ФРЕС антитіло, що описане в цьому документі), антитіла, сконструйовані введенням цистеїну, які можуть бути використані, наприклад, під час отримання кон'югатів антитіл, композицій, які містять кон'югати антитіл (наприклад, фармацевтичні композиції), а також способів їх отримання і застосування, наприклад, для застосування в терапевтичних цілях (наприклад, для лікування захворювань очей).

А. Ілюстративні антитіла для застосування в кон'югатах за винаходом

Винахід забезпечує кон'югати антитіл, які містять антитіла (наприклад, анти-ФРЕС антитіла), ковалентно зв'язані з полімерами (наприклад, монодисперсними полімерами). Можуть бути використані будь-які відповідні антитіла (наприклад, анти-ФРЕС антитіла). Наприклад, антитіло може специфічно зв'язуватися з антигеном, вибраним з групи, що складається з ФРЕС; інтерлейкіна-1 бета (ІЛ-1β); інтерлейкіна-6 (ІЛ-6); рецептора інтерлейкіна-6 (ІЛ-6R); інтерлейкіна-13 (ІЛ-13); рецептора ІЛ-13 (ІЛ-13R); TGFβR (наприклад, PDGF-BB); ангіопоетину; ангіопоетину-2 (Ang2); Tie2; S1P; інтегринів αvβ3, αvβ5, і α5β1; бетацеллюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора D комплементу; ФНП-α; HtrA1; рецептора ФРЕС (наприклад, ФРЕСР1, ФРЕСР2, ФРЕСР3, мембранозв'язаного рецептора ФРЕС (мзФРЕСР), або розчинного рецептора ФРЕС (рФРЕСР)); ST-2-рецептора; і білка, генетично пов'язаного з ризиком вікової макулярної дегенерації (ВМД) (наприклад, компонентів шляху комплементу C2, фактора В, фактора Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкіна-8 (ІЛ-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; і TNFRSF10A). Такі антитіла можуть бути корисні, наприклад, для зменшення ангіогенезу та/або для лікування або уповільнення прогресування порушення, пов'язаного з патологічним ангіогенезом (наприклад, хвороб очей). Ілюстративні, необмежуючі анти-ФРЕС антитіла, які можуть бути використані в кон'югатах антитіл за винаходом, описані нижче.

У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло може містити щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність $\text{GX}_1\text{TPX}_2\text{GGX}_3 \times \text{X}_5\text{YX}_6\text{DSVX}_7 \times \text{X}_8$ (SEQ ID NO: 2), де X_1 являє собою Ile або His, X_2 являє собою Ala або Arg, X_3 являє собою Tyr або Lys, X_4 являє собою Thr або Glu, X_5 являє собою Arg, Tyr, Gln, або Glu, X_6 являє собою Ala або Glu, X_7 являє собою Lys або Glu, і X_8 являє собою Gly або Glu; (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQX₁VSTAVA (SEQ ID NO: 4), де X_1 являє собою Asp або Arg; (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність X_1ASFLYS (SEQ ID NO: 5), де X_1 являє собою Ser або Met; і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність $\text{X}_1\text{QGYGX}_2\text{PFT}$ (SEQ ID

NO: 6), де X_1 являє собою Gln, Asn, або Thr, і X_2 являє собою Ala, Asn, Gln, або Arg, або комбінацію однієї або більше із зазначених вище HVR і одного або більше її варіантів, які мають щонайменше близько 80 % ідентичність послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % ідентичність) з будь-якою з SEQ ID NO: 1-6.

Наприклад, анти-ФПЕС антитіло може містити щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7), GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 21), або GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10) або QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23), або комбінації однієї або більше із зазначених вище HVR і одного або більш варіантів, які мають щонайменше близько 80 % ідентичність послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність) з будь-якою з SEQ ID NO: 1, 3, 7-10, або 21-23.

Наприклад, у деяких випадках анти-ФПЕС антитіло може містити щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10), або комбінації однієї або більше із зазначених вище HVR і одного або більш варіантів, які мають щонайменше близько 80 % ідентичність послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність) з будь-якою з SEQ ID NO: 1, 3, або 7-10. У конкретному прикладі, у деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10).

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-ФПЕС антитіл може містити одну, дві, три, або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену важкого ланцюга (FR): (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 16).

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-ФПЕС антитіл може містити одну, дві, три, або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену легкого ланцюга (FR): (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

Наприклад, у деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні FR варіабельного домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 16). У додаткових

випадках анти-ФРЕС антитіло містить наступні FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

Наприклад, у деяких випадках анти-ФРЕС антитіло може містити щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23), або комбінації однієї або більше із зазначених вище HVR і одного або більш варіантів, які мають щонайменше близько 80 % ідентичність послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність) з будь-якою з SEQ ID NO: 1, 3, 8, 9, 22, або 23. У конкретному прикладі, у деяких випадках анти-ФРЕС антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23).

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-ФРЕС антитіл може містити одну, дві, три, або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену важкого ланцюга (FR): (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) або EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32).

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-ФРЕС антитіл може містити одну, дві, три, або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену легкого ланцюга (FR): (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

Наприклад, у деяких випадках анти-ФРЕС антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23). У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло містить наступні FR варіабельного домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32). У додаткових випадках анти-ФРЕС антитіло містить наступні FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38.

У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить

амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23). У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні FR варіабельного домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLRSLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELVTSS (SEQ ID NO: 32). У додаткових випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38.

Наприклад, у деяких випадках анти-ФПЕС антитіло може містити щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10), або комбінації однієї або більше із зазначених вище HVR і одного або більше варіантів, які мають щонайменше близько 80 % ідентичності послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності) з будь-якою з SEQ ID NO: 1, 3, 8-10, або 22. У конкретному прикладі, у деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10).

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-ФПЕС антитіл може містити одну, дві, три, або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену важкого ланцюга (FR): (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLRSLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) або EEQLVEEGGGLVQPGESLRSLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELVTSS (SEQ ID NO: 32).

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-ФПЕС антитіл може містити одну, дві, три, або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену легкого ланцюга (FR): (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 17), DIQMTQSPESLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 25), або DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 26); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) або WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19) або GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

Наприклад, у деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить

наступні FR варіабельного домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFIS (SEQ ID NO: 29); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32). У додаткових випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYEYYADSVESG (SEQ ID NO: 22); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QGGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні FR варіабельного домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32). У додаткових випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить (a) варіабельний домен важкої ланцюга (VH), що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності) з, або послідовності будь-якої з SEQ ID NO: 11, 40 або 42; (c) варіабельний домен легкого ланцюга (VL), що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % ідентичності послідовності) з, або послідовності будь-якої SEQ ID NO: 12, 41, або 46; або (c) домен VH як в (a) і домен VL як в (b). Наприклад, у деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46.

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-ФПЕС антитіл може містити одну, дві, три, або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену важкого ланцюга (FR): (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14) або WVRQEPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 39); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16).

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-ФПЕС антитіл може містити одну, дві, три, або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену легкого ланцюга (FR): (a) FR-

L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 17) або DIQMTQSPSSLSASVGDRVITDC (SEQ ID NO: 45); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19),

5 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSATYYC (SEQ ID NO: 44), або GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC (SEQ ID NO: 54); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20) або FGQGTKVEVK (SEQ ID NO: 55).

У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність

35 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність

40 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність

45 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність

50 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність

55 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60). Наприклад, у деяких

випадках анти-ФПЕС антитіло може містити (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % ідентичність послідовності) з, або послідовність, SEQ ID NO: 11; (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність, яка має

60 щонайменше 90 % ідентичність послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % ідентичність послідовності) з, або послідовність, SEQ ID NO: 11; або (c) домен VH як в (a) і домен VL як в (b). У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло може

містити (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить

амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну

послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить

наступні ділянки ділянки важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 16). У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить наступні каркасні ділянки легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло містить зв'язуючий домен, який містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. У деяких випадках ілюстративне анти-ФПЕС являє собою N94A.F83A.N82aR.Y58R (також називається G6.31 AARR або G6.31.AARR).

У деяких випадках анти-ФПЕС антитіло може містити (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % ідентичність послідовності) з, або послідовність, SEQ ID NO: 33 або 51; (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність послідовності (наприклад, щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % ідентичність послідовності) з, або послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 12, 34, 35, 36, 37, або 38; або (c) домен VH як в (a) і домен VL як в (b). Наприклад, у деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37. У деяких випадках антитіло містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-ФПЕС антитіл може містити одну, дві, три, або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену важкого ланцюга (FR): FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) або EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30) або WVRQEPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 39); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSNTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGELVT VSS (SEQ ID NO: 32).

У деяких випадках будь-яке з попередніх анти-ФПЕС антитіл може містити одну, дві, три, або чотири з наступних каркасних ділянок варіабельного домену легкого ланцюга (FR): (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVITC (SEQ ID NO: 25), або DIQMTQSPSSLSASVGDEVITC (SEQ ID NO: 26); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) або WYQQKPGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19), GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 24), або GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

У деяких випадках винахід забезпечує антитіло, яке містить (a) важкий ланцюг, що містить

амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48 і/або (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50. У деяких варіантах здійснення антитіло являє собою G6.31AARR, що експресується у форматі Fab.

У деяких випадках винахід забезпечує антитіло, яке містить (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49 і/або (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50. У деяких варіантах здійснення антитіло являє собою варіант версії G6.31 AARR, який позбавлений реактивності до антитіла проти IgG людини.

У додатковому аспекті антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло) відповідно до будь-якого з вищеописаних варіантів здійснення може включати будь-яку з ознак, окремо або в комбінації, як описано в розділах 1-8 нижче:

1. Афінність антитіла

У деяких варіантах здійснення антитіло, яке запропоноване в цьому документі, має константу дисоціації (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ, або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М). Наприклад, у деяких випадках антитіло, яке запропоноване в цьому документі, зв'язує антиген (наприклад, людський ФРЕС (hVEGF)) з K_d близько 10 нМ або нижче. У деяких випадках антитіло, яке запропоноване в цьому документі, зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d близько 5 нМ або нижче. У деяких випадках антитіло, яке запропоноване в цьому документі, зв'язує антиген (наприклад, людський ФРЕС (hVEGF)) з K_d близько 2 нМ або нижче. Наприклад, у деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d від близько 25 пМ до близько 2 нМ (наприклад, близько 25 пМ, близько 50 пМ, близько 75 пМ, близько 100 пМ, близько 125 пМ, близько 150 пМ, близько 175 пМ, близько 200 пМ, близько 225 пМ, близько 250 пМ, близько 275 пМ, близько 300 пМ, близько 325 пМ, близько 350 пМ, близько 375 пМ, близько 400 пМ, близько 425 пМ, близько 450 пМ, близько 475 пМ, близько 500 пМ, близько 525 пМ, близько 550 пМ, близько 575 пМ, близько 600 пМ, близько 625 пМ, близько 650 пМ, близько 675 пМ, близько 700 пМ, близько 725 пМ, близько 750 пМ, близько 775 пМ, близько 800 пМ, близько 825 пМ, близько 850 пМ, близько 875 пМ, близько 900 пМ, близько 925 пМ, близько 950 пМ, близько 975 пМ, близько 1 нМ, близько 1,1 нМ, близько 1,2 нМ, близько 1,3 нМ, близько 1,4 нМ, близько 1,5 нМ, близько 1,6 нМ, близько 1,7 нМ, близько 1,8 нМ, близько 1,9 нМ, або близько 2 нМ). У деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d від близько 75 пМ до близько 600 пМ (наприклад, близько 75 пМ, близько 100 пМ, близько 125 пМ, близько 150 пМ, близько 175 пМ, близько 200 пМ, близько 225 пМ, близько 250 пМ, близько 275 пМ, близько 300 пМ, близько 325 пМ, близько 350 пМ, близько 375 пМ, близько 400 пМ, близько 425 пМ, близько 450 пМ, близько 475 пМ, близько 500 пМ, близько 525 пМ, близько 550 пМ, близько 575 пМ, близько 600 пМ). У деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d від близько 75 пМ до близько 500 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d від близько 75 пМ до близько 400 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d від близько 75 пМ до близько 300 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d від близько 75 пМ до близько 200 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d від близько 75 пМ до близько 150 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d від близько 75 пМ до близько 125 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d від близько 75 пМ до близько 100 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d близько 80 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d близько 60 пМ. У деяких випадках антитіло зв'язує антиген (наприклад, hVEGF) з K_d близько 40 пМ.

В одному варіанті здійснення K_d вимірюють за допомогою аналізу зв'язування антигена, міченого радіоактивним ізотопом (PIA). В одному варіанті здійснення PIA виконували з використанням Fab-версії антитіла, що являє інтерес, та його антигена. Наприклад, афінність зв'язування Fab у розчині щодо антигена вимірюють, врівноважуючи Fab мінімальною концентрацією (125 I)-міченого антигена в присутності ряду титрів неміченого антигена, потім іммобілізуючи зв'язаний антиген на покритому анти-Fab антитілом планшеті (див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Для визначення умов аналізу багатолункові планшети MICROTITER® (Thermo Scientific) покривали протягом ночі захоплюючим антитілом проти Fab (Cappel Labs) в концентрації 5 мкг/мл у 50 мкМ розчині карбонату натрію (pH 9,6), а потім блокували 2 % (мас./об.) розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА) у фосфатно-сольовому буфері (PBS) протягом від двох до п'яти годин за кімнатної температури (близько 23 °C). У неадсорбуючому планшеті (Nunc № 269620) змішували 100 пМ або 26 пМ [125 I]-антигена з послідовно розведеними розчинами досліджуваних Fab (наприклад, згідно з оцінкою анти-ФРЕС антитіла, Fab-12, в Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Потім Fab, що

являє інтерес, інкубували протягом ночі; у той самий час, інкубування могло тривати протягом більш тривалого періоду (наприклад, близько 65 годин) для забезпечення досягнення рівноваги. Потім суміш переносили на планшет для захоплення та інкубували за кімнатної температури (наприклад, протягом години). Потім розчин видаляли і планшет промивали вісім разів 0,1 % розчином полісорбату 20 (TWEEN-20®) у PBS. Після висихання планшетів додавали 150 мкл/лунка сцинтилятора (MICROSCINT-20™; Packard), а планшети зчитували на лічильнику гамма-випромінювання TOPCOUNT™ (Packard) протягом десяти хвилин. Концентрації кожного Fab, забезпечували зв'язування, яке менше або дорівнює 20 % від максимального, відбирали для використання в конкурентному аналізі зв'язування.

Згідно з іншим варіантом здійснення Kd вимірюють методом поверхневого плазмонного резонансу BIACORE®. Наприклад, аналіз з використанням BIACORE®-2000 або BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Піскатауей, Нью-Джерсі) виконували за температури 25 °C з чипами CM5 з іммобілізованим антигеном при приблизно 10 одиницях відповіді (RU). В одному варіанті здійснення біосенсорні чипи на основі карбоксиметильованим декстраном (CM5, BIACORE, Inc.) активували N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)-карбодіімідигідрохлоридом (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) за інструкціями виробника. Антиген розводять 10 мкМ ацетату натрію, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед впорскуванням при швидкості потоку 5 мкл/хв для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після введення антигена вводили 1 М розчин етаноламіну для блокування груп, які не прореагували. Для вимірювання кінетики вводять дворазові серійні розведення Fab (від 0,78 нМ до 500 нМ) у PBS, що містить 0,05 % полісорбату 20 (TWEEN-20™) як сурфактант (PBST), за температури 25 °C на швидкості потоку приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (k_{on}) та дисоціації (k_{off}) розраховували як прості моделі зв'язування Ленгмюра з відношенням один до одного (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) шляхом одночасної апроксимації сенсограмм асоціації та дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (Kd) розраховували, як співвідношення k_{off}/k_{on} . Див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Якщо швидкість перевищує $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ з вищеописаного способу поверхневого плазмонного резонансу, то швидкості прямої реакції можуть бути визначені за допомогою методу затухання флуоресценції, який вимірює підвищення або зниження інтенсивності флуоресцентного випромінювання (збудження = 295 нм; випромінювання = 340 нм, 16 нм смуга пропуску) за температури 25 °C 20 нМ антитіла проти антигена (Fab-форма) у PBS, за pH 7,2, у присутності зростаючих концентрацій антигена, що вимірюється спектрометром, таким як спектрофотометр з пристроєм зупинки потоку (Aviv Instruments) або спектрофотометр SLM-AMINCO™ 8000 серії (ThermoSpectronic) з перемішуваною кюветою.

2. Стабільність антитіла

У деяких випадках антитіло, що використовується в кон'югатах антитіл за винаходом або їх композиціях, має підвищену стабільність, наприклад, порівняно з анти-ФРЕС антитіла, наприклад, G6.31 (див., наприклад, патент США № 7758859 і публікації міжнародної заявки № WO 2005/012359, які включені в цей документ шляхом посилання у всій їх повноті). Стабільність антитіла може бути визначена з використанням будь-якого способу, відомого в цій галузі техніки, наприклад, диференціальної скануючої флуориметрії (DSF), циркулярного дихроїзму (CD), власної флуоресценції білка, диференціальної скануючої калориметрії, спектроскопії, світлорозсіювання (наприклад, динамічного світлорозсіювання (DLS) і статичного світлорозсіювання (SLS), хроматографії взаємодіючих молекул (SIC). Анти-ФРЕС антитіло може мати, наприклад, поліпшену температуру плавлення (T_m), температуру агрегації (T_{agg}), або інші показники стабільності у порівнянні з анти-ФРЕС антитілом, наприклад, G6.31.

У деяких варіантах здійснення антитіло, запропоноване в цьому документі, має T_m , яка більше або дорівнює близько 80 °C (наприклад, близько 81 °C, близько 82 °C, близько 83 °C, близько 84 °C, близько 85 °C, близько 86 °C, близько 87 °C, близько 88 °C, близько 89 °C, близько 90 °C, близько 91 °C, близько 92 °C або близько 93 °C). Наприклад, у деяких випадках анти-ФРЕС антитіло має T_m , яке більше або дорівнює приблизно 83,5 °C (наприклад, близько 83,5 °C, близько 84 °C, близько 85 °C, близько 86 °C, близько 87 °C, близько 88 °C, близько 89 °C, близько 90 °C, близько 91 °C, близько 92 °C або близько 93 °C). У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло має T_m від приблизно 82 °C до приблизно 92 °C (наприклад, близько 82 °C, близько 83 °C, близько 84 °C, близько 85 °C, близько 86 °C, близько 87 °C, близько 88 °C, близько 89 °C, близько 90 °C, близько 91 °C, або близько 92 °C). У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло має T_m близько 82 °C. У деяких випадках будь-яке з попередніх значень T_m анти-ФРЕС антитіла визначається з використанням DSF. У деяких варіантах здійснення значення T_m анти-ФРЕС антитіла визначають, як описано, наприклад, у Прикладі 1 міжнародної патентної заявки PCT/US2016/053454, яка включена в цей документ шляхом посилання у всій своїй повноті.

3. Фрагменти антитіл

У певних варіантах здійснення антитіло, яке запропоноване в цьому документі, являє собою фрагмент антитіла. Фрагменти антитіл включають, але не обмежуються ними, фрагменти Fab, Fab', Fab-C, Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, і scFv, та інші фрагменти, описані нижче. Огляд деяких фрагментів антитіл див. у Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003). Для огляду фрагментів scFv див., наприклад, Pluckthün, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); див. також WO 93/16185; патенти США №№ 5571894 та 5587458. Для обговорення фрагментів Fab та F(ab')₂, що містять залишки епітопа, який зв'язує рецептор респірації, і мають збільшений період напіввиведення in vivo, див. патент США № 5869046.

Діатіла являють собою фрагменти антитіл з двома антигензв'язуючими сайтами, які можуть бути двохвалентними або біспецифічними. Див., наприклад, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); і Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Тріатіла та тетраатіла також описані в Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Однодоменні антитіла являють собою фрагменти антитіл, які містять весь або частину варіабельного домену важкого ланцюга, або весь, або частину варіабельного домену легкого ланцюга антитіла. У деяких варіантах здійснення однодоменне антитіло являє собою людське однодоменне антитіло (Domantis, Inc., Волтем, Массачусетс; див., наприклад., патент США № 6248516 B1).

Фрагменти антитіл можуть бути отримані різними способами, зокрема, але не обмежуються ними, протеолітичне розщеплення інтактного антитіла, а також можуть бути отримані за допомогою рекомбінантних клітин-хазяїв (наприклад, E. coli або фага), як описано в цьому документі.

4. Химерні та гуманізовані антитіла

У певних варіантах здійснення антитіло, яке запропоноване в цьому документі, являє собою химерне антитіло. Деякі химерні антитіла описані, наприклад, в патенті США № 4816567 та статті Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984). В одному прикладі химерне антитіло містить нелюдську варіабельну ділянку (наприклад, варіабельний домен, отриманий від антитіла миші, щура, хом'яка, кролика або відмінного від людини примата, наприклад, мавпи) і константний домен людини. У додатковому прикладі химерне антитіло являє собою антитіло з "переключеним класом", в якого клас або підклас був змінений в порівнянні з вихідним антитілом. Термін "химерні антитіла" включає антигензв'язуючі фрагменти таких антитіл.

В окремих варіантах здійснення химерне антитіло являє собою гуманізоване антитіло. Як правило, антитіло нелюдського походження піддають гуманізації з метою зниження імуногенності для людини, зберігаючи при цьому специфічність і спорідненість вихідного антитіла нелюдського походження. Як правило, гуманізоване антитіло містить один або більше варіабельних доменів, у яких HVR, наприклад, CDR (або їх фрагменти) отримують з антитіла нелюдського походження, а FR (або їх фрагменти) отримують з послідовностей людських антитіл. У деяких випадках гуманізоване антитіло також містить щонайменше фрагмент константної ділянки людини. У деяких варіантах здійснення деякі FR залишки гуманізованого антитіла замінені відповідними залишками з антитіла нелюдського походження (наприклад, антитіла, з якого отримані залишки HVR), наприклад, для відновлення або поліпшення специфічності або афінності антитіла.

Гуманізовані антитіла і способи їх виготовлення розглянуті, наприклад, у Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), і додатково описані, наприклад, у Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989); патентах США № 5821337, 7527791, 6982321 та 7087409; Kashmiri et al., Methods 36: 25-34 (2005) (опис щеплення області, яка визначає специфічність (SDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (опис "зміна поверхні"); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (опис "перетасування FR"); і Osbourn et al., Methods 36: 61-68 (2005) і Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (опис підходу "спрямованої селекції" до перетасування FR).

Людські каркасні ділянки, які можуть бути використані для гуманізації, включають, але не обмежуються ними, каркасні ділянки, вибрані з використанням методу "найкращої відповідності" (див., наприклад, Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)); каркасні ділянки, отримані з консенсусної послідовності людських антитіл окремої підгрупи варіабельних ділянок легкого або важкого ланцюга (див., наприклад, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); і Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)); зрілі (які містять соматичні мутації) каркасні ділянки людини або ембріональні каркасні ділянки людини (див., наприклад, Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); та каркасні ділянки, отримані в результаті скринінгу бібліотек

FR (див., наприклад, Baca et al. J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) та Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

5. Людські антитіла

У певних варіантах здійснення антитіло, яке запропоноване в цьому документі, являє собою людське антитіло. Людські антитіла можуть бути отримані з використанням різних способів, відомих в цій галузі техніки. Людські антитіла описані в загальних рисах у van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) та Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

Людські антитіла можна отримати шляхом введення імуногена трансгенній тварині, яка модифікована з метою продукування інтактних антитіл людини або інтактних антитіл з варіабельними ділянками людини у відповідь на антигенну стимуляцію. Такі тварини, як правило, цілком або частково містять локуси імуноглобулінів людини, що заміщають ендogenous локуси імуноглобулінів або локалізовані поза хромосомою або випадковим чином інтегровані в хромосоми тварини. Як правило, у таких трансгенних мишей інактивовані ендogenous локуси імуноглобулінів. Огляд способів отримання антитіл людини з трансгенних тварин див. Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Також див., наприклад, патенти США №№ 6075181 і 6150584, що описують технологію XENOMOUSE™; патент США № 5770429, що описує технологію HUMAB®, патент США № 7041870, що описує технологію K-M MOUSE®, і публікацію патентної заявки США № US 2007/0061900, що описує технологію VELOCIMOUSE®). Людські варіабельні ділянки з інтактних антитіл, утворених такими тваринами, можуть додатково модифікуватися, наприклад, шляхом об'єднання з різними людськими консервативними ділянками.

Людські антитіла також можна отримувати за допомогою способів на основі гібридом. Були описані клітинні лінії людської мієломи і мишачо-людської гетеромієломи для отримання людських моноклональних антитіл. (Див., наприклад, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); і Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).) Антитіла людини, отримані за допомогою технології на основі В-клітинної гібридоми людини, також описані в Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006). Додаткові способи включають способи, описані, наприклад, у патенті США № 7189826 (який описує продукування моноклональних антитіл IgM людини з гібридомних клітинних ліній) і статті Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4): 265-268 (2006) (який описує гібридоми типу людина-людина). Технологія з використанням людських гібридом (технологія Trioma) також описана у Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) та у Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

Людські антитіла також можна отримувати шляхом виділення послідовностей варіабельного домену клону Fv з бібліотек фагового дисплею людського походження. Такі послідовності варіабельного домену можна поєднувати з необхідним константним доменом людини. Методи відбору людських антитіл з бібліотек антитіл описані нижче.

6. Антитіла, отримані з бібліотек

Антитіла за цим винаходом можуть бути виділені шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек антитіл з необхідною активністю або властивостями. Наприклад, у цій галузі техніки відомо безліч способів отримання бібліотек фагового дисплею та скринінгу таких бібліотек щодо антитіл, які володіють необхідними зв'язуючими характеристиками. Такі способи розглянуті, наприклад, у публікації Hoogenboom et al., in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001), і додатково описані, наприклад, у статтях McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597, (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); і Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004).

У деяких способах на основі фагового дисплею репертуари генів VH і VL окремо клонували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і випадковим чином рекомбінували у фагових бібліотеках, які потім можна піддавати скринінгу на наявність антигензв'язуючого фага, як описано в статті Winter et al. Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Фаг, як правило, являє собою фрагменти антитіл, як однопанцюгові фрагменти Fv (scFv), так і фрагменти Fab. Бібліотеки з імунованих джерел дозволяють отримати антитіла з високою афінністю до імуногена без необхідності конструювання гібридом. Альтернативно, можна клонувати наївний репертуар (наприклад, від людини) для отримання єдиного джерела антитіл до широкого спектра чужорідних антигенів та аутоантигенів без імунізації, як описано в статті Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Нарешті, наївні бібліотеки можна також отримати шляхом синтезу,

клонуючи сегменти V-генів стовбурових клітин, що не піддавалися реаранжируванню, і використовуючи ПЛР-праймери, що містять випадкові послідовності, для кодування гіперваріабельної ділянки CDR3 та здійснення реаранжирування *in vitro*, як описано в статті Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Патентні публікації, в яких описані фагові бібліотеки людських антитіл, включають, наприклад, патент США № 5750373, та публікації патентів США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, і 2009/0002360.

Антитіла або фрагменти антитіл можуть бути отримані з фагових бібліотек, як описано в міжнародній патентній заявці PCT/US2016/053454.

Антитіла або фрагменти антитіл, виділені з бібліотек антитіл людини, у цьому документі вважаються антитілами людини або фрагментами антитіл людини.

7. Мультиспецифічні антитіла

У деяких варіантах здійснення антитіло, запропоноване в цьому документі, являє собою мультиспецифічне антитіло, наприклад, біспецифічне антитіло. Мультиспецифічні антитіла являють собою моноклональні антитіла, які мають специфічності зв'язування відносно щонайменше двох різних сайтів. У деяких варіантах здійснення одна зі специфічностей зв'язування для ФРЕС та інші для будь-якого іншого антигена (наприклад, другої біологічної молекули, наприклад, інтерлейкіна-1 бета (ІЛ-1 β); інтерлейкіна-6 (ІЛ-6); рецептора інтерлейкіна-6 (ІЛ-6R); інтерлейкіна-13 (ІЛ-13); рецептора ІЛ-13 (ІЛ-13R); ТцФР (наприклад, PDGF-BB); ангіопоетину; ангіопоетину-2 (Ang2); Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора D комплементу; ФНП- α ; HtrA1; рецептора ФРЕС (наприклад, ФРЕСР1, ФРЕСР2, ФРЕСР3, мембранозв'язаного рецептора ФРЕС (мзФРЕСР), або розчинного рецептора ФРЕС (рФРЕСР); ST-2-рецептора; і білків, генетично пов'язаних з ризиком вікової макулярної дегенерації (ВМД) (таких як компоненти шляху комплементу C2, фактор В, фактор Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкін-8 (ІЛ-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CЕТР; LIPС; COL10A1; і TNFRSF10A). Відповідно, біспецифічні антитіла можуть мати специфічність зв'язування щодо ФРЕС і ІЛ-1 β ; ФРЕС і ІЛ-6; ФРЕС і ІЛ-6R; ФРЕС і ІЛ-13; ФРЕС і ІЛ-13R; ФРЕС і ТцФР (наприклад, PDGF-BB); ФРЕС і ангіопоетину; ФРЕС і Ang2; ФРЕС і Tie2; ФРЕС і S1P; ФРЕС і інтегрину $\alpha\beta 3$; ФРЕС і інтегрину $\alpha\beta 5$; ФРЕС і інтегрину $\alpha 5\beta 1$; ФРЕС і бетацеллюліну; ФРЕС і апеліну/APJ; ФРЕС і еритропоетину; ФРЕС і фактора D комплементу; ФРЕС і ФНП- α ; ФРЕС і HtrA1; ФРЕС і рецептора ФРЕС (наприклад, ФРЕСР1, ФРЕСР2, ФРЕСР3, мзФРЕСР, або рФРЕСР); ФРЕС і ST-2-рецептора; ФРЕС і C2; ФРЕС і фактора В; ФРЕС і фактора Н; ФРЕС і CFHR3; ФРЕС і C3b; ФРЕС і C5; ФРЕС і C5a; ФРЕС і C3a; ФРЕС і ARMS2; ФРЕС і TIMP3; ФРЕС і HLA; ФРЕС і ІЛ-8; ФРЕС і CX3CR1; ФРЕС і TLR3; ФРЕС і TLR4; ФРЕС і CЕТР; ФРЕС і LIPС; ФРЕС і COL10A1; або ФРЕС і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома різними епітопами ФРЕС. Біспецифічні антитіла також можуть застосовуватися для переміщення цитотоксичних агентів у клітини, які експресують ФРЕС. Біспецифічні антитіла можуть бути отримані як повнорозмірні антитіла або як фрагменти антитіл (наприклад, фрагменти Fab, Fab', або Fab-C).

У деяких випадках біспецифічне антитіло являє собою біспецифічне анти-ФРЕС/анти-ангіопоетин 2 (Ang2) антитіло, розкрите в заявці на патент США № US 2014/0017244, яка включена в цей документ шляхом посилання у всій своїй повноті. Наприклад, анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло може містити перший зв'язуючий домен, який зв'язує ФРЕС (наприклад, будь-яке з анти-ФРЕС антитіл, описаних в цьому документі), і другий зв'язуючий домен, який зв'язує ANG2, який містить (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність GYYMH (SEQ ID NO: 62); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 63); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SPNPYYYDSSGYYYPGAFDI (SEQ ID NO: 64); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO: 65); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність DDSDRPS (SEQ ID NO: 66); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QVWDSSSDHWV (SEQ ID NO: 67), або комбінації однієї або більше із зазначених вище HVR і одного або більш варіантів, які мають щонайменше близько 80 % ідентичність послідовності (наприклад, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність) з будь-якою з SEQ ID NO: 62-67.

У деяких випадках анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло може містити перший зв'язуючий домен, який зв'язує ФРЕС (наприклад, будь-яке з анти-ФРЕС антитіл, описаних у цьому документі), і другий зв'язуючий домен, який зв'язує Ang2, і містить (а) домен VH, що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 80 % ідентичність послідовності (наприклад, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % ідентичність послідовності) з, або послідовність,

SEQ ID NO: 68, (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 80 % ідентичність послідовності (наприклад, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність послідовності) з, або послідовність, SEQ ID NO: 69; або (c) домен VH як в (a) і домен VL як в (b).

5 У деяких випадках анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло може містити перший зв'язуючий домен, який зв'язує ФРЕС (наприклад, будь-яке з анти-ФРЕС антитіл, описаних в цьому документі), і другий зв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з Ang2, в якому другий зв'язуючий домен являє собою будь-який антитіло-зв'язуючий домен, описаний в публікації міжнародної патентної заявки № WO 2010/069532, яка включена в цей документ шляхом посилання в повному обсязі, або його варіант.

10 В інших випадках анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло являє собою будь-яке анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, описане в публікації міжнародної патентної заявки № WO 2016/073157.

15 У деяких випадках біспецифічні антитіло являє собою біспецифічне анти-ФРЕС/анти-ІЛ-6 антитіло. У деяких випадках анти-ФРЕС/анти-ІЛ-6 антитіло може містити перший зв'язуючий домен, який зв'язує ФРЕС (наприклад, будь-яке з анти-ФРЕС антитіл, описаних в цьому документі), і другий зв'язуючий домен, який зв'язує ІЛ-6. Другий зв'язуючий домен може представляти собою зв'язуючий домен будь-якого анти-ІЛ-6 антитіла, відомого в цій галузі техніки, наприклад, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; див., наприклад, WO 2016/073890, яка включена в цей документ шляхом посилання в повному обсязі), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсилімомаб, герилізмумаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, або його варіант.

20 У деяких випадках біспецифічні антитіло являє собою біспецифічне анти-ФРЕС/анти-ІЛ-6R антитіло. У деяких випадках анти-ФРЕС/анти-ІЛ-6R антитіло може містити перший зв'язуючий домен, який зв'язує ФРЕС (наприклад, будь-яке з анти-ФРЕС антитіл, описаних в цьому документі), і другий зв'язуючий домен, який зв'язує ІЛ-6R. Другий зв'язуючий домен може являти собою будь-який зв'язуючий домен анти-ІЛ-6R антитіла, відомий у цій галузі наприклад, WO 1992/019579, яка включена в цей документ шляхом посилання в повному обсязі), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237, або його варіант.

30 Методики отримання мультиспецифічних антитіл включають, але не обмежуються ними, рекомбінантну коекспресію двох пар важкого ланцюга-легкого ланцюга імунoglobulinів, що мають різну специфічність (див. Milstein and Cuellar, Nature 305: 537 (1983)), WO 93/08829, і Trautnecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)), і метод конструювання "виступ-у-западину" (див., наприклад, у патенті США № 5731168). Мультиспецифічні антитіла також можуть бути отримані шляхом конструювання з використанням ефекту електростатичної взаємодії для отримання молекул Fc-гетеродимерних антитіл (WO 2009/089004A1); шляхом перехресного зв'язування двох або більше антитіл або фрагментів (див., наприклад, патент США № 4676980, і Brennan et al. Science, 229: 81 (1985)); з використанням лейкоцинових застібок для створення біспецифічних антитіл (див., наприклад, Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); з використанням технології "діатіл" для отримання фрагментів біспецифічних антитіл (див., наприклад Hollinger et al. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); і з використанням одноланцюгових Fv (sFv) димерів (див., наприклад, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)); та отримання триспецифічних антитіл, як описано, наприклад, в Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

45 Сконструйовані антитіла з трьома або більш функціональними антигензв'язуючими сайтами, зокрема "антитіла-восьминоги", також включені в цей документ (див., наприклад US 2006/0025576A1).

У цьому документі антитіло або фрагмент також містить "FAb подвійної дії" або "DAF", який містить сайт зв'язування антигена, який зв'язується з ФРЕС, а також іншим, відмінним антигеном (див., наприклад, US 2008/0069820).

50 8. Варіанти антитіл

У деяких варіантах здійснення розглядаються варіанти амінокислотних послідовностей (наприклад, варіанти антитіл, що містять одну або більше змін амінокислотних залишків) антитіл, представлених у цьому документі. Наприклад, може бути бажаним поліпшення афінності зв'язування та/або інших біологічних властивостей антитіла. Варіанти амінокислотних послідовностей антитіла можна отримати шляхом внесення відповідних модифікацій у нуклеотидну послідовність, що кодує антитіло, або шляхом пептидного синтезу. Такі модифікації включають, наприклад, делеції та/або вставки, та/або заміни залишків в амінокислотних послідовностях антитіла. Для отримання кінцевого конструкта можна виконати будь-які комбінації делецій, вставок і заміни, за умови, що кінцевий конструкт має необхідні характеристики, наприклад, зв'язування антигена.

а) Варіанти заміни, вставок і делецій

У деяких варіантах здійснення запропоновані варіанти антитіл, що містять одну або більше амінокислотних заміни. Сайти, що являють інтерес для мутагенезу із замінами, включають HVR і FR. Консервативні заміни наведені в Таблиці 1 під заголовком "бажані заміни". Більш суттєві зміни представлені в Таблиці 1 під заголовком "ілюстративні заміни", і як додатково описано нижче з посиланням на класи амінокислотних бічних ланцюгів. Амінокислотні заміни можна вносити в антитіло, що являє інтерес, і проводити скринінг отриманих продуктів на необхідну активність, наприклад, збережене/покращене зв'язування з антигеном, зниження імуногенності або поліпшення АЗКЦ або КЗЦ.

Таблиця 1

Вихідний Залишок	Ілюстративні заміни	Бажані заміни
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Амінокислоти можна поділити на групи згідно з загальними властивостями бічних ланцюгів:

- (1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотні: Asp, Glu;
- (4) основні: His, Lys, Arg;
- (5) залишки, які впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;
- (6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни призводять до заміни представника одного з цих класів на представника іншого класу.

Один тип замінного варіанту включає заміну одного або більше залишків гіперваріабельної ділянки, та/або залишків FR вихідного антитіла (наприклад, гуманізоване або людське антитіло). Як правило, отриманий варіант(и), вибраний для подальшого вивчення, буде мати модифікації (наприклад, поліпшення) певних біологічних властивостей (наприклад, підвищену афінність, підвищену стабільність, підвищену експресію, змінену pI, і/або знижену імуногенність) у порівнянні з вихідним антитілом, і/або буде мати по суті збережені певні біологічні властивості вихідного антитіла. Ілюстративний варіант, одержаний шляхом заміни, являє собою антитіло з дозрілою афінністю, яке легко отримати, наприклад, з використанням методик дозрівання афінності на основі фагового дисплею, наприклад, описаних у цьому документі. Стисло, один або більше амінокислотних залишків HVR піддають мутації і варіантні антитіла експонують на поверхні фага та проводять скринінг на предмет конкретної біологічної активності (наприклад, афінності зв'язування).

Зміни (наприклад, заміщення) можуть бути зроблені в HVR, наприклад, для поліпшення афінності антитіла. Такі зміни можуть бути зроблені в "гарячих точках" HVR, тобто залишках, що кодовані, які піддаються мутації з високою частотою під час процесу соматичного дозрівання

(див., наприклад Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), та/або залишки, які контактують з антигеном, з тестуванням отриманого варіанту VH або VL на афінність зв'язування. Дозрівання афінності шляхом конструювання і повторного відбору з вторинних бібліотек було описано, наприклад, у *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). У деяких варіантах здійснення афінного дозрівання, різноманіття вводиться у варіабельні гени, вибрані для дозрівання будь-яким з безлічі способів (наприклад, ПЛР зниженої точності, перестановкою ланцюга або олігонуклеотид-спрямованим мутагенезом). Потім створюють вторинну бібліотеку. Потім бібліотеку піддають скринінгу з метою ідентифікації будь-яких варіантів антитіл, які мають бажану афінність. Ще один спосіб для внесення різноманітності включає підходи, спрямовані на HVR, в яких кілька амінокислотних залишків HVR (4-6 амінокислотних залишків посліпль) є рандомізованими. Залишки HVR, залучені до зв'язування антигена, можуть бути специфічно ідентифіковані, наприклад, з використанням аланін-скануючого мутагенезу або моделювання. Мішенями, зокрема, є CDR-H3 і CDR-L3.

У деяких варіантах здійснення заміни, вставки або делеції можуть відбуватися всередині однієї чи більше HVR за умови, що такі зміни суттєво не знижують здатність антитіла зв'язувати антиген. Наприклад, у HVR можна ввести консервативні модифікації (наприклад, консервативні заміни, як запропоновано в цьому документі), які не знижують афінність у значній мірі. Такі зміни можуть бути, наприклад, за межами залишків, що контактують з антигеном, в HVR. У деяких варіантах здійснення у варіантах послідовностей VH і VL, наведених раніше, кожен HVR або не змінений, або містить не більше однієї, двох або трьох амінокислотних замін.

У деяких варіантах здійснення заміни, вставки або делеції можуть відбуватися всередині однієї чи більше FR за умови, що такі зміни суттєво не знижують здатність антитіла зв'язувати антиген. Такі зміни можуть, наприклад, поліпшити афінність і/або стабільність антитіла (наприклад, як оцінено за допомогою підвищеної температури плавлення).

Придатний метод ідентифікації залишків або ділянок антитіла, які можуть бути мішенями для мутагенезу, називається "аланін-скануючим мутагенезом", як описано Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. У цьому способі амінокислотний залишок або групу цільових амінокислотних залишків (наприклад, заряджені амінокислотні залишки, такі як Arg, Asp, His, Lys і Glu) ідентифікують і замінюють нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (наприклад, аланіном або поліаланіном) з метою визначити, чи впливає це на взаємодію антитіла з антигеном. Додаткові заміни можуть бути внесені в ті розташування амінокислот, які виявляли функціональну чутливість до вихідних замін. В альтернативному або додатковому варіанті використовують кристалічну структуру комплексу антиген-антитіло для ідентифікації точок контакту між антитілом й антигеном. Такі контактні залишки та сусідні залишки можна використовувати як мішені або видаляти з кандидатів для заміни. Варіанти можна піддавати скринінгу з метою визначення наявності у них бажаних властивостей.

Амінокислотні вставки включають аміно- та/або карбокси-кінцеві злиття з діапазоном довжини від одного залишку до поліпептидів, що містять сто або більше залишків, а також вставки одного або більше амінокислотних залишків усередині послідовності. Приклади кінцевих вставок включають антитіло з N-кінцевим метіонільним залишком. Інші інсерційні варіанти молекули антитіла включають злиття з N - або C-кінцем антитіла з ферментом (наприклад, для терапії ADEPT) або поліпептидом, який збільшує час напіввиведення з сироватки крові.

b) Варіанти глікозилювання

У деяких варіантах здійснення антитіло, запропоноване в цьому документі, змінено з метою збільшення або зменшення ступеня глікозилювання антитіла. Додавання або делеції сайтів глікозилювання в антитілі легко здійснити шляхом модифікації амінокислотної послідовності, що призводить до створення або видалення одного або більше сайтів глікозилювання.

Якщо антитіло містить ділянку Fc, то можна модифікувати вуглевод, приєднаний до неї. Нативні антитіла, що продукуються клітинами ссавців, зазвичай містять розгалужений біантенарний олігосахарид, зазвичай приєднаний за допомогою N-зв'язку до Asn297 у домені CH2 ділянки Fc. Див., наприклад, Wright et al., *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Олігосахарид може містити різні вуглеводи, наприклад, манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу та сіалову кислоту, а також фукозу, приєднану до GlcNAc у "стеблі" біантенарної олігосахаридної структури. У деяких варіантах здійснення можна виконати модифікації олігосахариду в антитілі за цим винаходом з метою створення варіантів антитіл з певними поліпшеними властивостями.

В одному варіанті здійснення запропоновані варіанти антитіл, в яких вуглеводна структура, приєднана (або безпосередньо, або опосередковано) до ділянки Fc, має знижений вміст фукози. Наприклад, кількість фукози в такому антитілі може становити від 1 % до 80 %, від 1 %

до 65 %, від 5 % до 65 % або від 20 % до 40 %. Кількість фукози визначають, розраховуючи середню кількість фукози в цукровому ланцюзі Asn297 щодо загальної кількості глікоструктур, приєднаних до Asn 297 (наприклад, комплексних, гібридних або структур, які містять велику кількість манози), згідно з даними мас-спектрометрії MALDI-TOF, як описано, наприклад, у WO 2008/077546. Asn297 відноситься до залишку аспарагіну, розташованому в позиції 297 у ділянці Fc (відповідно до нумерації EU залишків ділянки Fc); при цьому Asn297 також може бути розташований на близько ± 3 амінокислот вище або нижче позиції 297, тобто між позиціями 294 і 300, внаслідок незначних варіацій послідовностей в антитілах. Такі фукозилізовані варіанти можуть мати поліпшену функцію АЗКЦ. Див., наприклад, патенти США №№ US 2003/0157108; US 2004/0093621. Приклади публікацій, пов'язаних з "дефукозилізованими" або "фукозодефіцитними" варіантами антитіла, включають: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Приклади ліній клітин, здатних виробляти дефукозилізовані антитіла, включають клітини CHO Lec13 з дефіцитом фукозилування білка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L, і WO 2004/056312 A1, Adams et al., особливо в Прикладі 11), і нокаутні лінії клітин, такі як нокаутні клітини CHO за геном альфа-1,6 - фукозилтрансферази, FUT8, (див., наприклад, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); і WO2003/085107).

Крім того, запропоновані варіанти антитіл з олігосахаридами, поділеними навпіл, наприклад, в яких біантенний олігосахарид, приєднаний до ділянки Fc антитіла, розділений по GlcNAc. Такі варіанти антитіл можуть характеризуватися зниженими фукозилуванням та/або покращеною функцією АЗКЦ. Приклади таких варіантів антитіл описані, наприклад, у заявці WO 2003/011878; в патенті США № 6602684; і US 2005/0123546 (Umana et al.). Крім того, запропоновані варіанти антитіл, які містять щонайменше один залишок галактози в складі олігосахариду, приєданого до ділянки Fc. Такі варіанти антитіл можуть мати поліпшену функцію КЗЦ. Такі варіанти антитіл описані, наприклад, у WO 1997/30087; WO 1998/58964; і WO 1999/22764 (Raju, S.).

с) Варіанти ділянки Fc

У певних варіантах здійснення у ділянку Fc антитіла, запропонованого в цьому документі, можуть бути введені одна або більше амінокислотних модифікацій, тим самим забезпечуючи створення варіанта ділянки Fc. Варіант ділянки Fc може містити послідовність людської ділянки Fc (наприклад, людської ділянки Fc IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4), що містить амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну) в одній або більше амінокислотних положеннях. У певних варіантах здійснення цей винахід забезпечує варіант антитіла, який має деякі, але не всі ефекторні функції, що робить його підходящим кандидатом для практичних застосувань, в яких важливе значення має період напіввиведення антитіла *in vivo*, хоча окремі ефекторні функції (такі як комплемент і АЗКЦ) не є необхідними або є шкідливими. Цитотоксичні аналізи можуть бути проведені *in vitro* та/або *in vivo* для підтвердження відновлення/ослаблення активності КЗЦ та/або АЗКЦ. Наприклад, щоб переконатися у відсутності зв'язування антитіла з FcγR (і, отже, відсутності активності АЗКЦ) можна виконати аналіз зв'язування з Fc-рецептором (FcR), зберігаючи здатність зв'язування з FcRn. Первинні клітини для опосередкування АЗКЦ експресують тільки FcγRIII, тоді як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Експресія FcR на гемопоетичних клітинах наведена в Таблиці 3 на сторінці 464 в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991).

Необмежуючі приклади аналізу *in vitro* для оцінки активності АЗКЦ молекули, що являє інтерес, описані в патенті № США 5500362 (див., наприклад, Hellstrom et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) і Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); патент США. № 5821337; і Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). В альтернативному варіанті можуть бути використані нерадіоактивні методи аналізу (див., наприклад, АСТІ™ нерадіоактивний аналіз цитотоксичності для проточної цитометрії (CellTechnology, Inc. Маунтін-В'ю, штат Каліфорнія; і CytoTox 96® нерадіоактивний аналіз цитотоксичності (Promega, Медісон, штат Вісконсін). Ефекторні клітини, які придатні для такого аналізу, включають мононуклеари периферичної крові (МПК) та натуральні клітини-кілери (NK). В альтернативному або додатковому варіанті активність АЗКЦ молекули, яка являє інтерес, можна оцінити *in vivo*, наприклад, на експериментальній моделі на тварині, як розкрито в Clynes et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Крім того, можна виконати аналіз зв'язування C1q з метою підтвердження нездатності антитіла зв'язувати C1q і, отже, відсутності активності КЗЦ. Див., наприклад, аналіз зв'язування C1q та C3c методом ІФА в WO 2006/029879 і

WO 2005/100402. Для оцінки активації комплементу може бути виконаний аналіз КЗЦ (див., наприклад, Gazzano-Santoro et al. J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg et al., Blood 101:1045-1052 (2003); і Cragg et al., Blood 103:2738-2743 (2004)). Крім того, можна визначити зв'язування та виведення/період напіввиведення FcRn in vivo з використанням способів, відомих у цій галузі техніки (див., наприклад, Petkova et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Антитіла зі зниженою ефекторною функцією включають антитіла із заміною одного або більше залишків 238, 265, 269, 270, 297, 327 та 329 ділянки Fc (патент № США 6737056). Такі мутанти Fc включають мутантів Fc із замінами в двох або більше амінокислотних позиціях 265, 269, 270, 297 і 327, зокрема так звані мутанти Fc "DANA" із заміною залишків 265 і 297 на аланін (патент США 7332581).

Описано деякі варіанти антитіл із поліпшеним або зменшеним зв'язуванням з FcR. (Див., наприклад, патент США № 6737056; міжнародну патентну заявку WO 2004/056312 і публікацію Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)).

У деяких варіантах здійснення варіант антитіла містить ділянку Fc з однієї або більше амінокислотними замінами, які покращують АЗКЦ, наприклад, із замінами у позиціях 298, 333 та/або 334 ділянки Fc (нумерація залишків за системою EU).

У деяких варіантах здійснення в ділянку Fc вносяться зміни, які призводять до зміни (тобто або до поліпшення, або до погіршення) зв'язування C1q та/або комплемент-залежної цитотоксичності (КЗЦ), наприклад, як описано в патенті США № 6194551, патенті WO 99/51642 та публікації Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Антитіла зі збільшеним періодом напіввиведення і поліпшеним зв'язуванням з неонатальним рецептором Fc (FcRn), який відповідає за перенесення материнських IgG до плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) і Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)), описані в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Зазначені антитіла містять ділянку Fc з однією або більше замінами, які покращують зв'язування ділянки Fc з FcRn. Такі варіанти Fc включають варіанти із замінами одного або більше залишків ділянки Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміну амінокислотного залишку 434 у ділянці Fc (патент США № 7371826). Див. також публікацію Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; і міжнародну патентну заявку WO 94/29351 щодо інших прикладів варіантів ділянки Fc.

d) Варіанти антитіл, сконструйовані введенням цистеїну

Винахід забезпечує антитіла, сконструйовані введенням цистеїну, в яких одну або більше амінокислот антитіла дикого типу або вихідного антитіла (наприклад, анти-ФРЕС антитіла, зокрема будь-які анти-ФРЕС антитіла, описані в цьому документі) замінюють (тобто, "заміщають" або "піддають мутації") амінокислотою цистеїном (тобто "сконструйованим цистеїном"). Будь-які форми антитіла можуть бути сконструйовані таким чином, тобто мutowані. Так, наприклад, вихідне моноклональне антитіло може бути сконструйовано, щоб утворити "антитіло TH1OMAB™". Одним з прикладів антитіла TH1OMAB™ є фрагмент антитіла (тобто Fab), який має сконструйований цистеїн. Це антитіло Fab TH1OMAB™ може згадуватися як "тіо-Fab". Слід зазначити, що мутація одного сайту дає єдиний сконструйований залишок цистеїну у тіо-Fab, в той час як мутація одного сайту дає два сконструйованих залишки цистеїну в антитілі TH1OMAB™ через димерну природу антитіла IgG.

Мутанти зі сконструйованими залишками цистеїну (Cys) можуть бути оцінені на реакційну здатність знову введених тіольних груп сконструйованого цистеїну. Значення реакційної здатності тіолу є відносним, чисельним значенням у діапазоні від 0 до 1,0 і може бути виміряне для будь-якого антитіла, сконструйованого введенням цистеїну. Значення реакційної здатності тіолу антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, відповідно до винаходу, знаходяться в діапазоні від 0,0 до 1,0. Як правило, значення реакційної здатності тіолу антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, за винаходом, знаходяться у діапазоні від 0,1 до 1,0. У певних варіантах здійснення значення реакційної здатності тіолу за винаходом знаходяться у діапазоні від 0,0 до 0,1, від 0,1 до 0,5, від 0,1 до 0,6, від 0,1 до 0,7, від 0,1 до 0,8, від 0,1 до 0,9, або від 0,1 до 1,0. У певних варіантах здійснення значення реакційної здатності тіолу за винаходом знаходяться у діапазоні від 0,2 до 1,0, від 0,3 до 1,0, від 0,4 до 1,0, від 0,5 до 1,0, від 0,6 до 1,0, від 0,7 до 1,0, або від 0,8 до 1,0. У певних варіантах здійснення значення реакційної здатності тіолу антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, за винаходом знаходяться у діапазоні від 0,6 до 1,0. У певних варіантах здійснення значення реакційної здатності тіолу антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, за винаходом знаходяться у діапазоні від 0,7 до 1,0. У певних варіантах здійснення значення реакційної здатності тіолу антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, за винаходом знаходяться у діапазоні від 0,8 до 1,0. У певних варіантах здійснення значення реакційної здатності тіолу антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, за винаходом знаходяться у діапазоні від 0,8 до 10. У певних варіантах здійснення значення реакційної здатності тіолу антитіл, сконструйованих

введенням цистеїну, за винаходом знаходяться у діапазоні від 0,5 до 0,8. У певних варіантах здійснення значення реакційної здатності тіолу антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, за винаходом знаходяться у діапазоні від 0,5 до 0,9. У деяких варіантах здійснення значення реакційної здатності тіолу антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, за винаходом знаходяться у діапазоні від 0,5 до 0,7. У певних варіантах здійснення значення реакційної здатності тіолу антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, за винаходом знаходяться у діапазоні від 0,5 до 1,0.

Способи конструювання, вибору і отримання за винаходом роблять можливим отримання антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, які є реакційноздатними з електрофільною функціональністю. Крім того, ці способи роблять можливим отримання сполук кон'югатів антитіл, таких як, наприклад, кон'югати антитіло-полімер з полімерними фрагментами, кон'югованими у заданих, сконструйованих, селективних сайтах. Реакційноздатні цистеїнові залишки на поверхні антитіла уможливають специфічне кон'югування полімеру за допомогою тіольної реакційноздатної групи, такої як малеїмід або галогенацетил. Нуклеофільна реакційноздатність тіольної функціональної групи залишку Cys до малеїмідної групи приблизно в 1000 разів вища порівняно з будь-якою іншою амінокислотною функціональною групою у білку, такою як аміногрупа залишків лізину або N-кінцева аміногрупа. Тіол-специфічна функціональна група в йодоацетильному і малеїмідному реагентах може реагувати з аміногрупами, але потрібні більш високий pH (> 9,0) і більш тривалий час реакції (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).

Антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, за винаходом переважно зберігає антигензв'язуючу здатність їх аналогів вихідного антитіла дикого типу. Таким чином, антитіла, сконструйовані введенням цистеїну, здатні переважно специфічно зв'язуватися з антигенами. Ілюстративні, необмежуючі антигени включають ФРЕС; ІЛ-1 β ; ІЛ-6; ІЛ-6R; ІЛ-13; ІЛ-13R; ТцФР (наприклад, PDGF-BB); ангіопоетин; ангіопоетин-2 (Ang2); Tie2; S1P; інтегрини $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюлін; апелін/APJ; еритропоетин; фактор D комплементу; ФНП- α ; HtrA1; рецептор ФРЕС (наприклад, ФРЕСР1, ФРЕСР2, ФРЕСР3, мзФРЕСР, або рФРЕСР); ST-2-рецептор; і білок, генетично пов'язаний з ризиком ВМД (наприклад, компоненти шляху комплементу C2, фактор В, фактор Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; ІЛ-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; і TNFRSF10A).

Будь-яке з описаних у цьому документі антитіл (наприклад, будь-яке з анти-ФРЕС антитіл, описаних вище), може являти собою вихідне антитіло, яке використовується для створення антитіла, сконструйованого введенням цистеїну. Ілюстративні способи, описані в цьому документі, можуть бути застосовані в цілому для ідентифікації та отримання антитіл шляхом застосування етапів конструювання і скринінгу, описаних у цьому документі.

Антитіла, сконструйовані введенням цистеїну, за винаходом можуть бути сайт-специфічно і ефективно з'єднані з реакційноздатним до тіолу реагентом. Реакційноздатний до тіолу реагент може бути, наприклад, агентом, який змінює кліренс, таким як полімер (наприклад, полімер ГК або різні ізомери поліетиленгліколю), пептидом, який зв'язується з третім компонентом, або іншим вуглеводом або ліпофільним агентом, багатофункціональним лінкерним реагентом, міченим реагентом захоплення, тобто афінності (наприклад біотин-лінкерним реагентом), міткою детекції (наприклад, флуорофорним реагентом), твердофазним іммобілізуючим реагентом (наприклад, SEPHAROSE™, полістиролом або склом) або проміжною сполукою лікарський засіб-лінкер. Одним прикладом реакційноздатного до тіолу реагенту є N-етил-малеїмід (NEM). В ілюстративному варіанті здійснення реакція антитіла THIOMAB™ з біотин-лінкерним реагентом забезпечує біотинільоване антитіло THIOMAB™, за допомогою чого можуть бути виявлені і виміряні наявність і реакційноздатність сконструйованого залишку цистеїну. Реакція антитіла THIOMAB™ з багатофункціональним лінкерним реагентом забезпечує антитіло THIOMAB™ з функціоналізованим лінкером, який далі може реагувати з полімером, реагентом фрагмента лікарського засобу або іншої міткою. Реакція антитіла THIOMAB™ з проміжною сполукою лікарський засіб-лінкер забезпечує кон'югат лікарського засобу з антитілом THIOMAB™. У деяких варіантах здійснення антитіло THIOMAB™ являє собою тіо-Fab.

Антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може бути кон'юговане з реакційноздатними до тіолу агентами, в яких реакційноздатна група являє собою, наприклад, малеїмід, йодоацетамід, піридилдисульфід або інший реакційноздатний до тіолу партнер кон'югації (див., наприклад, Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-

55, 643-671). Партнер може являти собою цитотоксичний агент (наприклад, токсин, такий як доксорубіцин або кашлюковий токсин), флуорофори, такі як флуоресцентний барвник, подібні флуоресцеїну або родаміну, хелатуючий агент для металів, які використовуються в діагностичній візуалізації або радіотерапії, пептидильна або непептидильна мітка або мітка детекції, або агент, що змінює кліренс, такий як полімер (наприклад, полімер ГК або різні ізомери поліетиленгліколю), пептид, який зв'язується з третім компонентом, або інший вуглевод або ліпофільний агент.

Аналіз PHESELECTOR (ІФА фага для відбору реакційноздатних тіолів) робить можливим визначення груп реакційноздатних цистеїнових груп в антитілах у фаговому форматі ІФА. Див. патент США № 7521541 і патент США № 20110301334, які включені в цей документ шляхом посилання у всій їх повноті. Зокрема, аналіз PHESELECTOR включає процес нанесення покриття білка, що являє інтерес, (наприклад, антитіла) на поверхні, з подальшим інкубуванням з фаговими частинками, а потім з вторинним антитілом, міченим пероксидазою хрому (HRP), з визначенням оптичної густини. Можна провести скринінг мутантних білків, експонованих фагом, швидким, надійним, високопродуктивним методом. Бібліотеки антитіл, сконструйованих введенням цистеїну, можуть бути створені і піддані відбору за зв'язуючою активністю, використовуючи той самий підхід, що і для ідентифікації відповідного включення реакційноздатних сайтів вільного Cys з випадкових білково-фагових бібліотек антитіл або інших білків. Ця методика включає реагування цистеїну мутантних білків, експонованих фагом, з афінним реагентом або репортерною групою, яка також є реакційноздатною до тіольної групи.

У певних варіантах здійснення аналіз PHESELECTOR включає наступні стадії: (1) бичачий сироватковий альбумін (БСА), частину або весь цільовий білок (наприклад, ФРЕС), і стрептавідин (100 мкл 2 мкг/мл) окремо наносили на 96-лункові планшети MAXISORB®; (2) після блокування 0,5 % Твіном-20 (у PBS), біотинільоване та небіотинільоване антитіло TH10MAB™-фаг (2×10^{10} фагових часток), інкубують протягом 1 години за кімнатної температури; (3) інкубацію з фагом з подальшою інкубацією з вторинним антитілом, міченим HRP, (антитіло до білку оболонки фага M13, білку pVIII); (4) стандартні реакції HRP проводять і вимірюють поглинання за 450 нм; (5) реакційну здатність тіолу вимірюють шляхом розрахунку відношення між $ОГ_{450}$ для стрептавідину/ $ОГ_{450}$ для цільового білка (наприклад, ФРЕС), таким чином, що значення реакційної здатності тіолу 1 вказує на повне біотинільування тіолу цистеїну.

ДНК, що кодує антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може бути легко виділена та секвенована з використанням звичайних процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла). Клітини гібридами служать як джерело такої ДНК. Після виділення ДНК може бути поміщена у вектори експресії, які потім трансфікують у клітини-хазяї, такі як клітини E. coli, мавпячі клітини COS, клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), клітини HEK293T, або інші клітини-хазяї ссавців, наприклад, клітини мієломи (патент США № 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310), які іншим способом не продукують білок антитіла, для досягнення синтезу моноклональних антитіл у рекомбінантних клітинах-хазяїнах. У більшості випадків отримані антитіла, сконструйовані введенням цистеїну, схожі з антитілами дикого типу.

Після конструювання і вибору антитіла, сконструйованого введенням цистеїну, наприклад, антитіла TH10MAB™, з високою реакційною здатністю непарних залишків Cys, можуть бути отримані шляхом: (i) експресії в бактеріальній, наприклад E. coli, системі або системі культури клітин ссавця (WO 01/00245), наприклад, у клітинах яєчника китайського хом'яка (CHO) або клітинах HEK293 (наприклад, клітинах HEK293T); і (ii) очищення з використанням загальних технологій очищення білків (наприклад, Lowman et al (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988). У конкретних варіантах здійснення антитіла TH10MAB™ експресуються в системі експресії клітин ссавців. У конкретних варіантах здійснення система експресії клітин ссавців являє собою клітини HEK293T.

Структурні положення сконструйованих залишків Cys важкого і легкого ланцюгів пронумеровані відповідно до системи послідовної нумерації. Ця система послідовної нумерації узгоджена з системою нумерації за Кабатом (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) для антитіла 4D5 на Фіг. 13A і 13B. Використовуючи систему нумерації за Кабатом, фактична лінійна амінокислотна послідовність може містити меншу або додаткову кількість амінокислот, що пов'язано з укороченням або вставками у FR або CDR варіабельного домену. Варіантні сайти легкого ланцюга і варіантні сайти важкого ланцюга, сконструйованих введенням цистеїну, визначають за схемами послідовної нумерації і нумерації за Кабатом на Фіг. 13A і 13B.

Реакційна здатність тіолу також може бути узагальнена на певні домени антитіла, такі як константний домен легкого ланцюга (CL) і константні домени важкого ланцюга, CH1, CH2 і CH3.

Цистеїнові заміни, що призводять до значень реакційної здатності тіолу, рівних 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, і 0,95, і вище, можуть бути зроблені у константних доменах важкого ланцюга α , δ , ϵ , γ , і μ інтактних антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, відповідно, зокрема підкласи IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, і IgA2.

5 Антитіла, сконструйовані можуть бути отримані, як описано, наприклад, у патенті США № 7521541 або міжнародній патентній публікації № WO 2006/034488, які включені в цей документ шляхом посилання у всій їх повноті. У деяких варіантах здійснення варіант антитіла, сконструйованого введенням цистеїну, являє собою варіант антитіла, сконструйованого введенням цистеїну, описаний в патенті США № 7521541 або міжнародній патентній публікації
10 № WO 2006/034488. У деяких випадках варіант антитіла, сконструйованого введенням цистеїну, являє собою варіант антитіла, сконструйованого введенням цистеїну, описаний в публікації міжнародної патентної заявки № WO 2011/156328 або в патенті США № 9000130, які включені в цей документ шляхом посилання у всій їх повноті. У деяких варіантах здійснення варіант антитіла, сконструйованого введенням цистеїну, являє собою варіант антитіла, сконструйованого введенням цистеїну, описаний в публікації міжнародної патентної заявки № WO 2016/040856, яка включена в цей документ шляхом посилання в повному обсязі, наприклад, у Таблицях 1-4 WO 2016/040856.

Наприклад, у певних варіантах здійснення цистеїнову мутацію вибирають з групи, що складається з HC-I195C, HC-S420C, HC-Y432C і LC-G64C (відповідно до нумерації за Кабатом).
20 У певних варіантах здійснення цистеїнову мутацію вибирають з групи, що складається з HC-Y432C і LC-G64C (відповідно до нумерації за Кабатом). У певних варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою мутацію важкого ланцюга і вибирається з групи, що складається з Y33C, G162C, V184C, I195C, S420C, Y432C і Q434C (відповідно до нумерації за Кабатом). У певних варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою мутацію важкого ланцюга і вибирається з групи, що складається з R19C, E46C, T57C, Y59C, A60C, M100cC, W103C, G162C, I195C, V258C, S420C, H425C, і N430C (згідно з нумерацією за Кабатом). У певних варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою мутацію важкого ланцюга і вибирається з групи, що складається з Y33C, G162C, V184C і I195C (відповідно до нумерації за Кабатом). У певних варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою мутацію важкого ланцюга і вибирається з групи, що складається з R19C, E46C, Y59C, A60C, M100cC, W103C, V258C, H425C, і N430C (відповідно до нумерації за Кабатом).
30

У певних варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою мутацію легкого ланцюга і вибирається з групи, що складається з Y55C, G64C, T85C, T180C, і N430C (відповідно до нумерації за Кабатом). У певних варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою мутацію легкого ланцюга і вибирається з групи, що складається з T31C, S52C, G64C, R66C, A193C, і N430C (відповідно до нумерації за Кабатом). У певних варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою мутацію легкого ланцюга і вибирається з групи, що складається з G64C, T85C, T180C і N430C (відповідно до нумерації за Кабатом). У певних варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою мутацію легкого ланцюга і вибирається з групи, що складається з S52C, G64C, R66C, A193C, і N430C (відповідно до нумерації за Кабатом). У конкретних варіантах здійснення цистеїнову мутацію в легкому ланцюзі вибирають з групи цистеїнових мутацій, що складається з LC-I106C, LC-R108C, LC-R142C, і LC-K149C (відповідно до нумерації за Кабатом) (див. Фіг. 13A; Таблиця 2).
40

У конкретному варіанті здійснення цистеїнова мутація в легкому ланцюзі являє собою LC-K149C (відповідно до нумерації за Кабатом) (див. Фіг. 13A). У конкретному варіанті здійснення цистеїнова мутація в легкому ланцюзі являє собою LC-V205C (відповідно до нумерації за Кабатом).
45

Таблиця 2

Ілюстративні цистеїнові мутації легкого ланцюга

Залишок	Послідовність (+/- 5 залишків)	SEQ ID NO.	Нумерація EU	Нумерація за Кабатом
I	GTKVECKRTVA	70	106	106
R	KVEIKCTVAAP	71	108	108
R	NNFYPCAEKVQ	72	142	142
K	AKVQWCVDNAL	73	149	149

У конкретних варіантах здійснення цистеїнову мутацію у важкому ланцюзі вибирають з групи цистеїнових мутацій, що складається з HC-T114C, HC-A140C, HC-L174C, HC-L179C, HC-T187C, HC-T209C, HC-V262C, HC-G371C, HC-Y373C, HC-E382C, HC-S424C, HC-N434C, і HC-Q438C (відповідно до нумерації EU) (див. Фіг. 13B; Таблиця 3).

У конкретному варіанті здійснення цистеїнова мутація у важкому ланцюзі являє собою HC-A143C відповідно до нумерації за Кабатом (тобто HC-A140C відповідно до нумерації EU) (див. Фіг. 13B; Таблиця 3). У конкретному варіанті здійснення цистеїнова мутація у важкому ланцюзі являє собою HC-A174C відповідно до нумерації EU (див. Фіг. 13B; Таблиця 3). У конкретному варіанті здійснення цистеїнова мутація у важкому ланцюзі являє собою HC-A118C відповідно до нумерації EU (тобто HC-A114C відповідно до нумерації за Кабатом).

У конкретному варіанті здійснення будь-яке антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, як описано в цьому документі, має одну з наступних цистеїнових мутацій: LC-K149C відповідно до нумерації за Кабатом і HC-A140C відповідно до нумерації EU (див. Таблиці 2 і 3 і Фіг. 13A і 13B).

Таблиця 3

Ілюстративні цистеїнові мутації важкого ланцюга

Залишок	Послідовність (+/- 5 залишків)	SEQ ID NO.	Нумерація EU	Нумерація за Кабатом
T	QGTLCVCVSSAS	74	114	110
A	TSGGTCALGCL	75	140	136
L	TFPAVCQSSGL	76	174	170
L	LQSSGCYSLSS	77	179	175
T	LSSVVCVPSSS	78	187	183
T	HKPSNCKVDKK	79	209	205
V	PEVTCCVVDVS	80	262	258
G	TCLVKCFYPSD	81	371	367
Y	LVKGFCPSDIA	82	373	369
E	IAVEWCSNGQP	83	382	378
S	QGNVFCCSVMH	84	424	420
N	HEALHCHYTQK	85	434	430
Q	HNHYTCKSLSL	86	438	434

У деяких варіантах здійснення цистеїном можна замінити один або більше з таких залишків: V205 (нумерація за Кабатом) у легкому ланцюзі, A118 (нумерація EU) у важкому ланцюзі і S400 (нумерація EU) у ділянці Fc важкого ланцюга.

У деяких варіантах здійснення антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може містити одну або більше цистеїнових мутацій важкого ланцюга, вибраних з групи, що складається з V2C, L4C, V5C, L11C, R19C, F27C, I29C, T32C, Y33C, Q39C, A40C, K43C, L45C, E46C, T53C, G55C, T57C, R58C, Y59C, A60C, T68C, N76C, Y79C, Q81C, W95C, G96C, D101C, W103C, T116C, K117C, T135C, N155C, A158C, G162C, G174C, L175C, T183C, V184C, I195C, N199C, S203C, F239C, M248C, E254C, V258C, N272C, V278C, L305C, T331C, S333C, R340C, Q343C, K356C, E384C, S399C, K410C, Q414C, G416C, N417C, Y432C, T433C, K435C, S438C, L439C, M100cC, і N82aC (відповідно до нумерації за Кабатом). Див. також Таблицю 3 міжнародної патентної заявки WO 2016/040856.

У деяких варіантах здійснення антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може містити одну або більше цистеїнових мутацій легкого ланцюга, вибраних з групи, що складається з S12C, S14C, G16C, R18C, T22C, R24C, Q27C, T31C, A32C, Q38C, K39C, G41C, K42C, P44C, Y49C, S50C, S52C, F53C, L54C, Y55C, S63C, G64C, R66C, D70C, T72C, T74C, S76C, Q79C, T85C, H91C, Y92C, P95C, T97C, F98C, K103C, E105C, K107C, P119C, K126C, T129C, S131C, Q147C, W148C, A153C, Q155C, S156C, S159C, Q160C, S162C, Q166C, T172C, T180C, V191C, A193C, E195C, V205C, T206C, і N210C (відповідно до нумерації за Кабатом). Див. також Таблицю 4 міжнародної патентної заявки WO 2016/040856.

У деяких варіантах здійснення антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може містити одну або більше цистеїнових мутацій, вибраних з групи, що складається з HC-I195C, HC-S420C, HC-Y432C і LC-G64C (згідно з нумерацією за Кабатом). Див. також Таблицю 5 міжнародної патентної заявки WO 2016/040856.

У деяких варіантах здійснення антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, містить цистеїнові мутації легкого ланцюга, вибрані з групи сайтів, що складаються з LC-T22C, LC-K39C,

LC-Y49C, LC-Y55C, LC-T85C, LC-T97C, LC-I106C, LC-R108C, LC-R142C, LC-K149C, і LC-V205C (згідно з нумерацією за Кабатом).

Антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може містити будь-яку відповідну кількість сконструйованих залишків цистеїну, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 або більше сконструйованих залишків цистеїну. У деяких варіантах здійснення антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може містити 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, або 1-10 сконструйованих залишків цистеїну. У деяких варіантах здійснення антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може містити 1 сконструйований залишок цистеїну. У деяких варіантах здійснення антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може містити 2 сконструйованих залишки цистеїну. У деяких варіантах здійснення антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може містити 3 сконструйованих залишки цистеїну.

У будь-якому з попередніх варіантів здійснення антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, може містити сконструйований цистеїн в еквівалентній позиції, як будь-яку з цистеїнових мутацій, описаних вище. Наприклад, якщо антитіло містить нативний серин у позиції 118 (нумерація EU), серин може бути замінений на цистеїн з утворенням мутації S118C.

Наприклад, винахід забезпечує анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, що містить цистеїнову мутацію у важкому ланцюзі, вибрану з групи, що складається з HC-A118C, HC-A140C і HC-L174C (нумерації EU), або цистеїнову мутацію в легкому ланцюзі, вибрану з групи, що складається з LC-V205C і LC-K149C (нумерація за Кабатом), причому анти-ФРЕС антитіло являє собою ФРЕС антитіло, описане в цьому документі, наприклад, будь-яке анти-ФРЕС антитіло, описане в Таблицях 8-10. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR). У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою G6.31 ДТ. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою LC-N94A. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою LC-N94A.LC-F83A. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою LC-N94A.LC-F83A. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE). У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою HCcombo. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою HCLC2. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою HCLC4. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою HCLC5. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою HCLC3. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою HCLC1. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою R19HCombo. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою R19HCLC2. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою R19HCLC4. У деяких варіантах здійснення анти-ФРЕС антитіло являє собою R19HCLC5.

На конкретному прикладі винахід забезпечує анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, що містить цистеїнову мутацію у важкому ланцюзі, вибрану з групи, що складається з HC-A118C, HC-A140C і HC-L174C (нумерація EU), або цистеїнову мутацію у легкому ланцюзі, вибрану з групи, що складається з LC-V205C і LC-K149C (нумерація за Кабатом), причому зазначене антитіло містить наступні шість HVR: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, містить наступні FR варіабельного домену важкого ланцюга: (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKN TAYLQMRS LRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16). У додаткових випадках анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, містить наступні FR варіабельного домену легкого ланцюга: (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17); (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, містить (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12. У деяких випадках вихідне антитіло являє собою G6.31 AARR. У

деяких варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою HC-A118C. В інших варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою HC-A140C. В інших варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою HC-L174C (нумерація EU). В інших варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою LC-V205C (нумерація за Кабатом). В інших варіантах здійснення цистеїнова мутація являє собою LC-K149C (нумерація за Кабатом).

У деяких випадках винахід забезпечує антитіло, яке містить (а) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 90, і/або (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 89.

У деяких випадках винахід забезпечує антитіло, яке містить (а) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 92, і/або (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 91.

У деяких випадках винахід забезпечує антитіло, яке містить (а) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 94, і/або (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 93.

е) Похідні антитіл

У певних варіантах здійснення антитіло, запропоноване в цьому документі, може бути додатково модифіковане для включення додаткових небілкових компонентів, які відомі в цій галузі техніки і загальнодоступні. Фрагменти, придатні для одержання похідних антитіла, включають водорозчинні полімери, але не обмежуються ними. Необмежуючі приклади водорозчинних полімерів включають поліетиленгліколь (ПЕГ), кополімери етиленгліколю та пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, кополімер етилену/малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (гомополімери або випадкові кополімери) та декстран або полі(п-вінілпіролідон) поліетиленгліколь, гомополімери пропіленгліколю, кополімери пропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксietiльовані поліолі (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт та їх суміші, але не обмежуються ними. Пропіоновий альдегід поліетиленгліколю може мати переваги для виробництва через його стабільність у воді. Зазначений полімер може мати будь-яку молекулярну масу та бути розгалуженим або нерозгалуженим. Кількість полімерів, приєднаних до антитіла, може змінюватися, і якщо приєднано більше одного полімеру, вони можуть бути однаковими або різними молекулами. В цілому, кількість та/або тип полімерів, використовуваних для дериватизації, можна визначити з урахуванням факторів, що включають, але не обмежуються ними, конкретні властивості або функції антитіла, що підлягають поліпшенню, незалежно від того, чи буде похідне антитіла використовуватися в терапії за певних умов і тому подібне. Додаткові кон'югати антитіл описані в цьому документі, наприклад, у розділі G нижче і в Прикладах 1 і 2.

В іншому варіанті здійснення запропоновані кон'югати антитіл і небілкового компонента, які можна вибірково нагрівати шляхом опромінення. В одному варіанті здійснення небілковий компонент являє собою вуглецеву нанотрубку (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). Випромінювання може мати будь-яку довжину хвилі та включає, але не обмежуються ними, довжини хвиль, які не завдають шкоди звичайним клітинам, але які нагрівають небілковий компонент до температури, за якою клітини, що розташовані близько до антитіло-небілкового компоненту, гинуть.

ф) Варіанти ізоелектричної точки

Винахід відноситься до варіантів антитіл зі зміненими ізоелектричними точками. Наприклад, винахід відноситься до варіантів антитіл зі зниженою ізоелектричною точкою (pI), наприклад, у порівнянні з анти-ФРЕС антитілами, наприклад, G6.31. У деяких випадках поверхневий заряд зменшується за фізіологічного pH. У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло має pI, рівну або меншу, ніж близько 8 (наприклад, близько 8, близько 7, близько 6, близько 5, або близько 4). У деяких випадках антитіло має pI близько від 4 до близько 8 (наприклад, близько 4, близько 5, близько 6, близько 7, або близько 8). У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло має pI від близько 5 до близько 7 (наприклад, близько 5, близько 6, або близько 7). У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло має pI від близько 5 до близько 6 (наприклад, близько 5,1, близько 5,2, близько 5,3, близько 5,4, близько 5,5, близько 5,6, близько 5,7, близько 5,8, близько 5,9, або близько 6).

Антитіла за винаходом можуть бути сконструйовані так, щоб мати знижену pI, наприклад, шляхом заміни амінокислотних залишків дикого типу в заданій позиції амінокислотою, що має більш низьку pI. pI амінокислоти може бути визначена на основі значень pKa аміну (-NH₂), карбонової кислоти (-COOH), і бічного ланцюга амінокислоти, які відомі в цій галузі техніки. У деяких варіантах здійснення експоновані на поверхні амінокислотні залишки можуть бути заміщені для зменшення pI антитіла. В одному варіанті здійснення експоновані на поверхні амінокислотні залишки можуть бути заміщені глутаматом (E). В одному варіанті здійснення

експоновані на поверхні амінокислотні залишки можуть бути заміщені аспартатом (D).

В. Рекombінантні способи та композиції

Будь-яке з антитіл (наприклад, анти-ФРЕС антитіл, зокрема анти-ФРЕС антитіл, сконструйованих введенням цистеїну), описаних в цьому документі, може бути отримано з використанням рекombінантних способів і композицій, наприклад, як описано в патенті США № 4816567. В одному варіанті здійснення запропонована виділена нуклеїнова кислота, що кодує анти-ФРЕС антитіло, описане в цьому документі. Така нуклеїнова кислота може кодувати амінокислотну послідовність, що містить VL, та/або амінокислотну послідовність, що містить VH антитіла (наприклад, легкий та/або важкий ланцюг антитіла). У додатковому варіанті здійснення запропоновано один або більше векторів (наприклад, векторів експресії), що містять такі нуклеїнові кислоти. У додатковому варіанті здійснення запропонована клітина-хазяїн, що містить таку нуклеїнову кислоту. В одному такому варіанті здійснення клітина-хазяїн містить (наприклад, трансформована): (1) вектор, який містить нуклеїнову кислоту, що кодує амінокислотну послідовність, яка містить VL антитіла, та амінокислотну послідовність, яка містить VH антитіла; або (2) перший вектор, який містить нуклеїнову кислоту, що кодує амінокислотну послідовність, яка містить VL антитіла, і другий вектор, який містить нуклеїнову кислоту, що кодує амінокислотну послідовність, яка містить VH антитіла. В одному варіанті здійснення клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину, наприклад, клітину яєчника китайського хом'яка (CHO) або лімфоїдну клітину (наприклад, клітину Y0, NS0, Sp20). В одному варіанті здійснення запропоновано спосіб отримання анти-ФРЕС антитіла, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна, яка містить нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, як зазначено вище, в умовах, відповідних для експресії антитіла, і, в деяких випадках виділення антитіла з клітини-хазяїна (або з середовища для культивування клітини-хазяїна).

Для рекombінантної продукції антитіла (наприклад, анти-ФРЕС антитіла, зокрема анти-ФРЕС антитіла, сконструйованого введенням цистеїну), нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, наприклад, як описано раніше, виділяють і вбудовують в один або більше векторів для подальшого клонування та/або експресії у клітині-хазяїні. Така нуклеїнова кислота може бути легко виділена та секвенована з використанням звичайних процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла).

Придатні клітини-хазяї для клонування або експресії векторів, що кодують антитіло, включають прокаріотичні або еукаріотичні клітини, описані в цьому документі. Наприклад, антитіла можна продукувати в бактеріях, зокрема, якщо глікозилювання і Fc-ефекторні функції не є необхідними. Для експресії фрагментів антитіл і поліпептидів у бактеріях, див., наприклад, патенти США №№ 5648237, 5789199, і 5840523. Див. також Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), стор. 245-254, в якій описана експресія фрагментів антитіл в *E. coli*. Після експресії антитіло може бути виділено з пасти бактеріальних клітин у розчинній фракції і може бути додатково очищено.

На додаток до прокаріотів, придатних для клонування або експресії векторів, що кодують антитіло, хазяї являють собою еукаріотичні мікроорганізми, наприклад, міцеліальні гриби або дріжджі, зокрема штами грибів і дріжджів з "гуманізованими" шляхами глікозилювання, що призводить до продукції антитіла з профілем глікозилювання, частково або повністю характерним для людини. Див. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), і Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Придатні для експресії глікозилюваного антитіла клітини-хазяї також походять від багатоклітинних організмів (безхребетних і хребетних). Приклади клітин безхребетних включають клітини рослин і комах. Виявлені численні штами бакуловірусів, які можна використовувати у комбінації з клітинами комах, особливо для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*.

Культури клітин рослин також можуть бути використані як хазяї. Див., наприклад, патенти США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 і 6417429 (які описують технологію PLANTIBODIES™ для отримання антитіл у трансгенних рослинах).

Клітини хребетних також можуть бути використані як хазяї. Наприклад, можна використовувати лінії клітин ссавців, які адаптовані для росту в суспензії. Інші приклади відповідних клітинних ліній ссавців-хазяїв являють собою лінію нирки мавпи CV1, трансформовану SV40 (COS-7); лінію ембріональних клітин людської нирки (293 або клітини 293, як описано, наприклад, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клітини нирки новонародженого хом'яка (BHK); клітини Сертолі миші (клітини TM4, описані, наприклад, у Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клітини нирки мавпи (CV1); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирки собаки

(MDCK, клітини печінки сірого щура лінії Buffalo (BRL 3A), клітини легенів людини (W138), клітини печінки людини (Hep G2), клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562), клітини TRI, як описано, наприклад, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клітини MRC 5 і клітини FS4. Інші відповідні лінії клітин ссавців включають клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), зокрема клітини DHFR-CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); і мієломні клітинні лінії, такі як Y0, NS0 і Sp2/0. Огляд деяких ліній клітин-хазяїв ссавців, придатних для отримання антитіл, див., наприклад, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

С. Аналізи

Антитіла (наприклад, анти-ФРЕС антитіла, описані в цьому документі, зокрема анти-ФРЕС антитіла, сконструйовані введенням цистеїну), а також кон'югати антитіл (наприклад, кон'югати антитіл, які містять анти-ФРЕС антитіла (наприклад, будь-яке анти-ФРЕС антитіло, представлене в цьому документі)), можуть бути ідентифіковані, піддані скринінгу, або охарактеризовані за їх фізико-хімічними властивостями та/або біологічною активністю за допомогою різних аналізів, відомих у цій галузі техніки.

1. Аналізи зв'язування та інші аналізи

В одному аспекті антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, зокрема анти-ФРЕС антитіла, сконструйованого введенням цистеїну), або кон'югат такого антитіла, досліджують на антигензв'язуючу активність, наприклад, за допомогою відомих методів, таких як ІФА, вестерн-блот, і т. д.

В іншому аспекті конкурентні аналізи можуть бути використані для ідентифікації антитіла, яке конкурує з антитілом, як описано в цьому документі, або кон'югату такого антитіла, за зв'язування з антигеном (наприклад, ФРЕС). У деяких варіантах здійснення таке конкуруюче антитіло зв'язується з одним і тим самим епітопом (наприклад, лінійним або конформаційним епітопом), який зв'язується з антитілом, як описано в цьому документі. Детальний опис типових способів картування епітопа, з яким зв'язується антитіло, представлено в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," в *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

У типовому конкурентному аналізі іммобілізований ФРЕС інкубують в розчині, який містить перше мічене антитіло, яке зв'язується з ФРЕС, і друге немічене антитіло, яке досліджують щодо його спроможності конкурувати з першим антитілом за зв'язування з ФРЕС. Друге антитіло може бути присутнім в супернатанті гібридоми. Як контроль іммобілізований ФРЕС інкубують у розчині, що містить перше мічене антитіло, але не друге немічене антитіло. Після інкубації в умовах, що забезпечують зв'язування першого антитіла з ФРЕС, видаляють надлишок незв'язаного антитіла і вимірюють кількість мітки, зв'язаної з іммобілізованим ФРЕС. Якщо кількість мітки, зв'язаної з іммобілізованим ФРЕС, істотно знижується в досліджуваному зразку щодо контрольного зразка, то це вказує на те, що друге антитіло конкурує з першим антитілом за зв'язування з ФРЕС. Аналогічні аналізи можуть бути проведені для інших антигенів. Див. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Аналізи активності

В одному аспекті представлені аналізи для ідентифікації антитіл (наприклад, анти-ФРЕС антитіл, зокрема анти-ФРЕС антитіла, сконструйовані введенням цистеїну) або кон'югатів таких антитіл, що мають біологічну активність. Біологічна активність може включати, наприклад, зв'язування з антигеном (наприклад, ФРЕС (наприклад, ФРЕС у кровотоці)), або його пептидним фрагментом, або *in vivo*, *in vitro*, або *ex vivo*. У деяких варіантах здійснення біологічна активність може включати блокування або нейтралізацію антигена. Наприклад, у деяких варіантах здійснення біологічна активність може включати блокування або нейтралізацію ФРЕС або запобігання зв'язування ФРЕС з лігандом, наприклад, рецептором, таким як KDR або Flt-1. Також запропоновані антитіла або кон'югати таких антитіл, що мають таку біологічну активність *in vivo* та/або *in vitro*. У деяких варіантах здійснення антитіло за винаходом, або кон'югати таких антитіл, тестували на таку біологічну активність.

3. Аналізи стабільності

В одному аспекті запропоновані аналізи для визначення стабільності (наприклад, термостабільності) антитіла (наприклад, анти-ФРЕС, зокрема анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югату такого антитіла. Наприклад, стабільність антитіла або кон'югату такого антитіла може бути визначена з використанням будь-якого способу, відомого в цій галузі техніки, наприклад, диференціальної скануючої флуориметрії (DSF), циркулярного дихроїзму (CD), власної флуоресценції білка, диференціальної скануючої калориметрії, спектроскопії, світлорозсіювання (наприклад, динамічного світлорозсіювання (DLS) і статичного світлорозсіювання (SLS), хроматографії взаємодіючих молекул (SIC).

Стабільність антитіла або кон'югату такого антитіла може бути визначена, як описано в цьому документі, наприклад, з використанням DSF, як описано, наприклад, у Прикладах 1 і 2 міжнародної патентної заявки № PCT/US2016/053454. У деяких випадках стабільність кон'югату антитіла може бути визначена за допомогою гель-ексклюзійної хроматографії з підключеним рефрактометричним детектором і детектором багатокутового лазерного світлорозсіювання (SEC-RI-MALS), наприклад, як описано в Прикладі 1.

D. Фармацевтичні складки

Фармацевтичні складки антитіла (наприклад, анти-ФРЕС антитіла, зокрема анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югату такого антитіла, представлені в цьому документі, отримують шляхом змішування такого антитіла або кон'югату антитіла, що має бажаний ступінь чистоти, з одним або більше необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), у формі ліофілізованих складів або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії зазвичай є нетоксичними для реципієнтів у використовуваних дозах і концентраціях, і включають: буферні речовини, наприклад, фосфат, цитрат і інші органічні солі; антиоксиданти, зокрема аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (наприклад, хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію; хлорид бензетонію; фенол; бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, наприклад, метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; та m-крезол); низькомолекулярні (містять менше 10 амінокислотних залишків) поліпептиди; білки, наприклад, сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, наприклад, полівінілпіролідон; амінокислоти, наприклад, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, зокрема глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, наприклад, ЕДТА; вуглеводи, наприклад, сахарозу, маніт, трегалозу або сорбіт; солеутворюючі протиіони, наприклад, натрію; металовмісні комплекси (наприклад, комплекси Zn-білок) та/або неіоногенні ПАВ, наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ). Приклади фармацевтично прийнятних носіїв у цьому документі додатково включають засоби, що забезпечують внутрішньотканинний розподіл лікарських засобів, такі як розчинні нейтрально-активні глікобілки, які містять гіалуронідазу (sHASEGP), наприклад, розчинні глікобілки PH-20 людини, містять гіалуронідазу, такі як rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Деякі приклади sHASEGP і способи застосування, зокрема rHuPH20, описані в публікаціях патентів США №№ 2005/0260186 і 2006/0104968. В одному аспекті sHASEGP об'єднують з однією або більше додатковими глюкозаміногліканазами, такими як хондроїтинази.

Ілюстративні ліофілізовані складки антитіл описані в патенті США № 6267958. Водні складки антитіл включають ті, які описані в патенті США № 6171586 і WO2006/044908, останні складки містять гістидин-ацетатний буфер.

Лікарська форма, описана в цьому документі, також може містити більше однієї активної сполуки, необхідної для конкретного показання, що підлягає лікуванню, переважно з додатковими видами активності, які не чинять негативного впливу один на одного. Наприклад, може існувати потреба в забезпеченні імуносупресивного агента. Такі молекули присутні в належній комбінації в кількостях, які є ефективними для використання за призначенням.

Активні інгредієнти можна включити в мікрокапсули, отримані, наприклад, методом коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, мікрокапсули з гідроксиметилцелюлози або желатину і мікрокапсули з полі(метилметакрилату), відповідно; у колоїдні системи для доставки лікарських препаратів (наприклад, у ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методи розкриті в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Композиції, призначені для застосування in vivo, зазвичай є стерильними. Стерильність може бути легко досягнута, наприклад, шляхом фільтрації через стерильні фільтрувальні мембрани.

У певних варіантах здійснення фармацевтичний склад містить одну або більше додаткових сполук. У певних варіантах здійснення додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, вибраною з групи, що складається з: IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; T ζ ФР; ангіопоетину; ангіопоетину-2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора D комплементу; ФНП- α ; HtrA1; рецептора ФРЕС; ST-2-рецептора; і білків, генетично пов'язаних з ризиком вікової макулярної дегенерації (ВМД), таких як компоненти шляху комплементу C2, фактор В, фактор Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

Наприклад, у деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, таке як RG-7716 або будь-яке анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, розкриті у WO 2010/069532 або WO 2016/073157.

В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою анти-ІЛ-6 антитіло, наприклад EBI-031 (Eleven Biotech; див., наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсилімомаб, герилізмумаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, або його варіант.

У ще одному прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою анти-ІЛ-6R антитіло, наприклад тоцилізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237, або його варіант.

Е. Терапевтичні способи та композиції

Будь-які антитіла (наприклад, анти-ФРЕС, зокрема анти-ФРЕС антитіла, сконструйовані введенням цистеїну) або їх кон'югати (наприклад, кон'югати монодисперсної ГК), представлені в цьому документі, можуть бути використані в терапевтичних способах.

В одному аспекті пропонується анти-ФРЕС антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) для застосування як лікарський засіб. В іншому аспекті пропонується кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) для застосування як лікарський засіб. В інших аспектах винахід забезпечує анти-ФРЕС антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) для застосування при лікуванні порушення, пов'язаного з патологічним ангиогенезом. В інших аспектах винахід забезпечує кон'югат антитіла (наприклад, монодисперсний ГК кон'югат) для застосування при лікуванні порушення, пов'язаного з патологічним ангиогенезом. У деяких варіантах здійснення порушення, пов'язане з патологічним ангиогенезом, являє собою захворювання очей. У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД, суху форму ВМД, ВМД на проміжній стадії, ВМД на пізній стадії, або географічну атрофію сітківки (ГА)), макулярну дегенерацію, макулярний набряк, ДМН (наприклад, фокальний нецентральный ДМН або дифузний центральний ДМН), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (ДР) (наприклад, проліферативну ДР (ПДР), непроліферативну ДР (НПДР), або високогірну ДР), інші ретинопатії, пов'язані з ішемією, РН, оклюзію вен сітківки (ОВС) (наприклад, форми оклюзії центральної вени сітківки (ОЦВС) і гілки центральної вени сітківки (ОГВС)), ХНВ (наприклад, міопічну ХНВ), неоваскуляризацію рогівки, хвороби, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, хвороби, пов'язані з неоваскуляризацією сітківки / хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічну міопію, хворобу Гіппеля-Ліндау, гістоплазмоз очей, СЕВ, хворобу Коутса, хворобу Норрі, OPRG, субкон'юнктивальний крововилив, рубець, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярну глаукому, пігментний ретиніт (ПР), гіпертонічну ретинопатію, ретинальну ангиоматозну проліферацію, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію райдужки, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, кістозний макулярний набряк (КМН), васкуліт, набряк диска зорового нерва, ретиніт, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний та неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт), вроджений амавроз Лебера, увеїт (зокрема інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, мультифокальний хоріоїдит), гістоплазмоз очей, блефарит, синдром сухого ока, травматичне пошкодження очей, синдром Шегрена.

В іншому аспекті пропонується анти-ФРЕС антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) для застосування у способі лікування. В іншому аспекті пропонується кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) для застосування у способі лікування. У деяких випадках винахід забезпечує анти-ФРЕС антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) для застосування в способі лікування суб'єкта, що має порушення, пов'язане з патологічним ангиогенезом, що включає введення індивідууму ефективної кількості анти-ФРЕС антитіла. Винахід також відноситься до кон'югату антитіла (наприклад, кон'югату монодисперсної ГК) для застосування у способі лікування суб'єкта, що має порушення, пов'язане з патологічним ангиогенезом, що включає введення індивідууму ефективної кількості кон'югату антитіла. У деяких випадках порушення, пов'язане з патологічним ангиогенезом, являє собою захворювання очей. У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД, суху форму ВМД, ВМД на проміжній стадії, ВМД на пізній стадії, або географічну атрофію сітківки (ГА)), макулярну дегенерацію, макулярний набряк, ДМН (наприклад, фокальний нецентральный ДМН або дифузний центральний ДМН), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (ДР) (наприклад, проліферативну ДР (ПДР), непроліферативну ДР (НПДР), або високогірну ДР), інші ретинопатії, пов'язані з ішемією, РН, оклюзію вен сітківки (ОВС) (наприклад, форми оклюзії центральної вени сітківки (ОЦВС) і гілки центральної вени сітківки (ОГВС)), ХНВ (наприклад, міопічну ХНВ), неоваскуляризацію

рогівки, хвороби, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, хвороби, пов'язані з неоваскуляризацією сітківки / хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічну міопію, хворобу Гіппеля-Ліндау, гістоплазмоз очей, СЕВ, хворобу Коутса, хворобу Норрі, OPPG, субкон'юнктивальний крововилив, рубеоз, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярну глаукому пігментний ретиніт (ПР), гіпертонічну ретинопатію, ретинальну ангіоматозну проліферацію, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію райдужки, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, кістозний макулярний набряк (КМН), васкуліт, набряк диска зорового нерва, ретиніт, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний та неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт), вроджений амавроз Лебера, увеїт (зокрема інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, мультифокальний хоріоїдит), гістоплазмоз очей, блефарит, синдром сухого ока, травматичне пошкодження очей, синдром Шегрена.

У деяких випадках винахід забезпечує анти-ФРЕС антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) для застосування в зниженні або інгібуванні ангіогенезу у суб'єкта. В іншому аспекті пропонується кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) для застосування в зниженні або інгібуванні ангіогенезу у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення винахід забезпечує анти-ФРЕС антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло) для застосування в способі зниження або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, що включає введення індивідууму ефективного анти-ФРЕС антитіла для зниження або інгібування ангіогенезу. Винахід також забезпечує кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) для застосування в способі зниження або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, що включає введення індивідууму ефективної кількості кон'югату антитіла. "Суб'єкт" за будь-яким з вищевказаних застосувань може являти собою людину.

Винахід відноситься до застосування анти-ФРЕС антитіла (наприклад, анти-ФРЕС антитіла, сконструйованого введенням цистеїну) у виготовленні або отриманні лікарського засобу. Винахід також відноситься до застосування кон'югату антитіла (наприклад, кон'югату монодисперсної ГК) у виготовленні або отриманні лікарського засобу. Наприклад, в одному прикладі лікарський засіб призначений для лікування порушення, пов'язаного з патологічним ангіогенезом. У додатковому прикладі лікарський засіб призначений для застосування в способі лікування порушення, пов'язаного з патологічним ангіогенезом, що включає введення суб'єкту, який має порушення, пов'язане з патологічним ангіогенезом, ефективної кількості лікарського засобу. У деяких випадках порушення, пов'язане з патологічним ангіогенезом, являє собою захворювання очей. У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД, суху форму ВМД, ВМД на проміжній стадії, ВМД на пізній стадії, або географічну атрофію сітківки (ГА)), макулярну дегенерацію, макулярний набряк, ДМН (наприклад, фокальний нецентральный ДМН або дифузний центральний ДМН), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (ДР) (наприклад, проліферативну ДР (ПДР), непроліферативну ДР (НПДР), або високогірну ДР), інші ретинопатії, пов'язані з ішемією, РН, оклюзію вен сітківки (ОВС) (наприклад, форми оклюзії центральної вени сітківки (ОЦВС) і гілки центральної вени сітківки (ОГВС)), ХНВ (наприклад, міопічну ХНВ), неоваскуляризацію рогівки, хвороби, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, хвороби, пов'язані з неоваскуляризацією сітківки / хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічну міопію, хворобу Гіппеля-Ліндау, гістоплазмоз очей, СЕВ, хворобу Коутса, хворобу Норрі, OPPG, субкон'юнктивальний крововилив, рубеоз, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярну глаукому пігментний ретиніт (ПР), гіпертонічну ретинопатію, ретинальну ангіоматозну проліферацію, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію райдужки, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, кістозний макулярний набряк (КМН), васкуліт, набряк диска зорового нерва, ретиніт, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний та неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт), вроджений амавроз Лебера, увеїт (зокрема інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, мультифокальний хоріоїдит), гістоплазмоз очей, блефарит, синдром сухого ока, травматичне пошкодження очей, синдром Шегрена. В іншому прикладі лікарський засіб призначений для зниження або інгібування ангіогенезу у суб'єкта. У додатковому прикладі лікарський засіб призначений для застосування в способі зниження або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, що включає введення суб'єкту кількості, ефективної для зниження або інгібування ангіогенезу. У будь-якому з попередніх застосувань лікарських засобів спосіб може включати введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, наприклад, як описано нижче.

Винахід забезпечує спосіб лікування порушення, пов'язаного з патологічним ангіогенезом. В одному варіанті здійснення спосіб включає введення індивідууму, що має порушення, яке пов'язане з патологічним ангіогенезом, ефективної кількості анти-ФРЕС антитіла (наприклад, анти-ФРЕС антитіла, сконструйованого введенням цистеїну). В іншому прикладі спосіб включає

введення індивідууму, що має порушення, яке пов'язане з патологічним ангиогенезом, ефективною кількістю кон'югату антитіла (наприклад, кон'югату монодисперсної ГК). У деяких випадках порушення, пов'язане з патологічним ангиогенезом, являє собою захворювання очей. У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД, суху форму ВМД, ВМД на проміжній стадії, ВМД на пізній стадії, або географічну атрофію сітківки (ГА)), макулярну дегенерацію, макулярний набряк, ДМН (наприклад, фокальний нецентральный ДМН або дифузний центральний ДМН), ретинопатію, діабетичну ретинопатію (ДР) (наприклад, проліферативну ДР (ПДР), непроліферативну ДР (НПДР), або високогірну ДР), інші ретинопатії, пов'язані з ішемією, РН, оклюзію вен сітківки (ОВС) (наприклад, форми оклюзії центральної вени сітківки (ОЦВС) і гілки центральної вени сітківки (ОГВС)), ХНВ (наприклад, міопічну ХНВ), неоваскуляризацію рогівки, хвороби, пов'язані з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризацію сітківки, хвороби, пов'язані з неоваскуляризацією сітківки / хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічну міопію, хворобу Гіппеля-Ліндау, гістоплазмоз очей, СЕВ, хворобу Коутса, хворобу Норрі, ОРРГ, субкон'юнктивальний крововилив, рубеоз, неоваскулярне захворювання очей, неоваскулярну глаукому пігментний ретиніт (ПР), гіпертонічну ретинопатію, ретинальну ангиоматозну проліферацію, макулярну телеангіектазію, неоваскуляризацію райдужки, внутрішньоочну неоваскуляризацію, дегенерацію сітківки, кістозний макулярний набряк (КМН), васкуліт, набряк диска зорового нерва, ретиніт, кон'юнктивіт (наприклад, інфекційний та неінфекційний (наприклад, алергічний) кон'юнктивіт), вроджений амавроз Лебера, увеїт (зокрема інфекційний і неінфекційний увеїт), хоріоїдит (наприклад, мультифокальний хоріоїдит), гістоплазмоз очей, блефарит, синдром сухого ока, травматичне пошкодження очей, синдром Шегрена. У додаткових випадках спосіб додатково включає введення індивідууму ефективною кількістю щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, наприклад, як описано нижче. "Суб'єкт" за будь-яким з вищевказаних способів може являти собою людину.

Передбачається, що антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК), за цим винаходом, можна використовувати для лікування ссавця. В одному варіанті здійснення антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) вводять ссавцю, яка не є людиною, наприклад, з метою отримання, наприклад, доклінічних даних. Ілюстративні ссавці, що не є людиною, які підлягають лікуванню, включають приматів, що не є людиною, собак, кішок, гризунів (наприклад, мишей і щурів) та інших ссавців, для яких проводять доклінічні дослідження. Такі ссавці можуть являти собою стандартні тваринні моделі для захворювання, що підлягає лікуванню антитілом, або можуть бути використані для вивчення токсичності або фармакокінетики антитіла, що являє інтерес. У кожному з цих варіантів здійснення для ссавця можуть бути проведені дослідження з підвищенням дози. Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) можна вводити гризуну-хазяїну, наприклад, у моделі солідної пухлини. Антитіло або кон'югат антитіла можна вводити хазяїну (наприклад, гризуна, наприклад, кролику) для очних фармакокінетичних досліджень, наприклад, шляхом інтравітреального введення (наприклад, інтравітреальної ін'єкції) або за допомогою пристрою доставки, що імплантується.

У додатковому аспекті винахід забезпечує фармацевтичні складки, що містять будь-яке з антитіл (наприклад, анти-ФРЕС антитіл, сконструйованих введенням цистеїну) або кон'югатів антитіл (наприклад, кон'югатів монодисперсної ГК), представлених у цьому документі, наприклад, для застосування в будь-якому з вищевказаних терапевтичних способах. В одному варіанті здійснення фармацевтичний склад містить будь-яке з антитіл (наприклад, анти-ФРЕС антитіл, сконструйованих введенням цистеїну) або кон'югатів антитіл (наприклад, кон'югатів монодисперсної ГК), представлених в цьому документі, і фармацевтично прийнятний носій. В іншому варіанті здійснення фармацевтичний склад містить будь-яке з антитіл (наприклад, анти-ФРЕС антитіл, сконструйованих введенням цистеїну) або кон'югатів антитіл (наприклад, кон'югатів монодисперсної ГК), представлених в цьому документі, і щонайменше один додатковий терапевтичний агент, наприклад, як описано нижче. У певних варіантах здійснення фармацевтичний склад містить одну або більше додаткових сполук. У певних варіантах здійснення додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, вибраною з групи, що складається з: ІЛ-1 β ; ІЛ-6; ІЛ-6R; ІЛ-13; ІЛ-13R; ТцФР; ангиопоетину; Ang2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, і $\alpha5\beta1$; бетацеллюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора D комплементу; ФНП- α ; HtrA1; рецептора ФРЕС; ST-2-рецептора; і білків, генетично пов'язаних з ризиком вікової макулярної дегенерації (ВМД), таких як компоненти шляху комплементу C2, фактор В, фактор Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкіна 8 (ІЛ-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LPC; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення

додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. Наприклад, у деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, таке як RG-7716 або будь-яке анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, розкриті у WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант. В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою анти-ІЛ-6 антитіло, наприклад EBI-031 (Eleven Biotech; див., наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсилімомаб, герилізмумаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, або його варіант. У ще одному прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою анти-ІЛ-6R антитіло, наприклад тоцилізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237, або його варіант.

Антитіла (наприклад, анти-ФРЕС антитіла, сконструйовані введенням цистеїну) або кон'югати антитіл (наприклад, кон'югати монодисперсної ГК) можуть бути використані або окремо, або в комбінації з іншими агентами в терапії. Наприклад, антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) можна вводити спільно з щонайменше одним додатковим терапевтичним агентом. У деяких варіантах здійснення додатковий терапевтичний агент являє собою інше антитіло, антиангіогенний агент, імуносупресивний агент, цитокін, антагоніст цитокіна, кортикостероїд, протиблювотний засіб, протиракову вакцину, анальгетик або їх комбінації.

Наприклад, у деяких варіантах здійснення будь-якого з попередніх способів додатково включає введення однієї або більше додаткових сполук. У деяких варіантах здійснення антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) вводять одночасно з додатковою сполукою (сполуками). У деяких варіантах здійснення антитіло або кон'югат антитіла вводять до або після додаткової сполуки (сполук). У певних варіантах здійснення додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, вибраною з групи, що складається з: ІЛ-1 β ; ІЛ-6; ІЛ-6R; ІЛ-13; ІЛ-13R; ТцФР; ангіопоетину; Ang2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, і $\alpha5\beta1$; бетацеллюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора D комплементу; ФНП- α ; HtrA1; рецептора ФРЕС; ST-2-рецептора; і білків, генетично пов'язаних з ризиком ВМД, таких як компоненти шляху комплементу C2, фактор В, фактор Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкіна 8 (ІЛ-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; C5P; LIPC; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

У деяких варіантах здійснення відповідно до (стосовно) будь-яких з описаних вище варіантів здійснення захворювання очей являють собою інтраокулярне неоваскулярне захворювання, вибране з групи, що складається з проліферативних ретинопатій, хоріоїдальної неоваскуляризації (ХНВ), вікової макулярної дегенерації (ВМД), діабетичної і інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, діабетичного макулярного набряку, патологічної міопії, хвороби Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очі, оклюзії вени сітківки (ОВС), зокрема ОЦВС та ОГВС, неоваскуляризації роівки, неоваскуляризації сітківки та ретинопатії недоношених (РН). Наприклад, у деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, таке як RG-7716 або будь-яке анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, розкриті у WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант. В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою анти-ІЛ-6 антитіло, наприклад EBI-031 (Eleven Biotech; див., наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсилімомаб, герилізмумаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, або його варіант. У ще одному прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою анти-ІЛ-6R антитіло, наприклад тоцилізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237, або його варіант.

У деяких випадках антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з щонайменше одним додатковим терапевтичним агентом для лікування захворювання очей, наприклад, захворювання очей, описаного в цьому документі (наприклад, ВМД (наприклад, волога ВМД), ДМН, ДР або ОВС). Ілюстративні додаткові терапевтичні агенти для комбінованої терапії для лікування захворювань очей включають, без обмеження, антиангіогенні агенти, такі як антагоністи ФРЕС, зокрема, наприклад, анти-ФРЕС антитіла (наприклад, анти-ФРЕС Fab LUCENTIS® (ранібізумаб)), злиті білки розчинного рецептора (наприклад, рекомбінантний злитий білок розчинного рецептора EYLEA® (афліберсепт, також відомий як VEGF Trap Eye; Regeneron/Aventis)), аптамери (наприклад, анти-ФРЕС пегільований аптамер MACUGEN® (пегатаніб натрію; NeXstar Pharmaceuticals/OSI Pharmaceuticals)), і інгібітори тирозинкінази ФРЕСР (наприклад, 4-(4-бромо-2-флуораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназолін (ZD6474), 4-(4-флуоро-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-

7-(3-піролідин-1-ілпропокси)хіназолін (AZD2171), ваталаніб (PTK787), семаксамініб (SU5416; SUGEN), і SUTENT® (сунітиніб)); триптофаніл-тРНК-синтетаза (TrpRS); скваламін; RETAANE® (анекортав ацетат для депо-суспензії; Alcon, Inc.); проліки комбретастатину А4, (CA4P); MIFEPREX® (міфепристон-ru486); триамцинолону ацетонід для субтенонового введення; кристалічний триамцинолону ацетонід для інтравітреального введення; інгібітори матричної металопротеїнази (наприклад, приномастат (AG3340; Pfizer)); флуороцинолону ацетонід (зокрема інтраокулярний імплантат флуороцинолону; Bausch & Lomb/Control Delivery Systems); ліномід; інгібітори функції інтегрину β3; ангіостатину, а також їх комбінації. Ці та інші терапевтичні агенти, які можуть бути введені в комбінації з кон'югатом антитіла за винаходом, описані, наприклад, у заявці на патент США № US 2014/0017244, яка включена в цей документ шляхом посилання у всій своїй повноті.

Інші приклади додаткових терапевтичних агентів, які можуть бути використані в комбінації з антитілом (наприклад, анти-ФРЕС антитілом, сконструйованим введенням цистеїну) або кон'югатом антитіла (наприклад, монодисперсним кон'югатом ГК) за винаходом для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС), включають, але не обмежуються ними, VISUDYNE® (вертепорфін; препарат, що активується світлом, який, як правило, використовується в комбінації з фотодинамічною терапією з нетепловим лазером), РК412, ендовіон (Endovion) (NS 3728; NeuroSearch A/S), нейротрофічні фактори (наприклад, гліальний нейротрофічний фактор (GDNF) і циліарний нейротрофічний фактор (CNTF)), дилтіазем, дорзоламід, PHOTOTROP®, 9-цис-ретиналь, очні лікарські засоби (наприклад, йодид фосфоліну, ехотіофат або інгібітори карбоангідрази), неовастат (AE-941; AEterna Laboratories, Inc.), Sirna-027 (AGF-745; Sima Therapeutics, Inc.), нейротрофіни (зокрема, тільки як приклад, NT-4/5, Genentech), Cand5 (Acuity Pharmaceuticals), INS-37217 (Inspire Pharmaceuticals), антагоністи інтегрину (зокрема антагоністи інтегрину від Jerini AG і Abbott Laboratories), EG-3306 (Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (BioDiem Ltd.), талідомід (використовуваний, наприклад, EntreMed, Inc.), кардіотрофін-1 (Genentech), 2-метоксиестрадіол (Allergan/Oculex), DL-8234 (Toray Industries), NTC-200 (Neurotech), тетратіомолібдат (Мічиганський університет), LYN-002 (Lynkeus Biotech), сполуку з мікроводоростей (Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (Celltech Group plc), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), ТФР-бета 2 (Genzyme/Celtrix), інгібітори тирозинкінази (наприклад, від Allergan, SUGEN, або Pfizer), NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (OPTIS France SA), нейропротектори гангліїв клітин сітківки (Cogent Neurosciences), похідні N-нітропіразолу (Texas A&M University System), KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals), циклоспорин А, терапевтичні агенти, які використовуються у фотодинамічній терапії (наприклад, VISUDYNE®; спрямовану на рецептор PDT, Bristol-Myers Squibb, Co.; порфімер натрію для ін'єкції разом з PDT; вертепорфін QLT Inc.; ротапорфін з PDT, Miravent Medical Technologies; талапорфін натрію з PDT, Nippon Petroleum; і мотексафін лютецій, Pharmacyclics, Inc.), антисенсові олігонуклеотиди (зокрема тільки як приклад, продукти, протестовані Novagali Pharma SA і ISIS-13650, Isis Pharmaceuticals), і їх комбінації.

Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна застосовувати в комбінації з терапією або хірургічною процедурою для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР, або ОВС), зокрема, наприклад, лазерну фотокоагуляцію (наприклад, панретинальну фотокоагуляцію (PRP)), обробку друз лазером, хірургію макулярних розривів сітківки, хірургічну транслокацію макули, мініатюрні телескопи, що імплантуються, ангіографію Phi-руху (також відому як мікролазерна терапія та або ангіографія фідерних судин), бомбардування протонним пучком, мікростимулюючу терапію, хірургію з приводу відшарування сітківки і операцію на склоподібному тілі, операцію вдавнення сфери, субмакулярну хірургію, транспупілярну термотерапію, терапію фотосистеми I, застосування РНК-інтерференції (РНКі), екстракорпоральний реоферез (відомий також як мембранна диференціальна фільтрація і реотерапія), імплантацію мікрочипів, терапію стовбуровими клітинами, генну замісну терапію, генну терапію на основі рибозимів (зокрема генну терапію з використанням елементу відповіді на гіпоксію, Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; і генна терапія PDEF, GenVec), трансплантацію фоторецепторних/ретинальних клітин (зокрема епітеліальні клітини сітківки, що трансплантуються, Diacrin, Inc.; трансплантат ретинальних клітин, Cell Genesys, Inc.), акупунктуру, і їх комбінації.

У деяких випадках антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з антиангіогенним агентом для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС). Будь-який відповідний антиангіогенний агент може бути використаний в комбінації з антитілом (наприклад, анти-ФРЕС антитілом, сконструйованим введенням

цистеїну) або кон'югатом антитіла за винаходом, зокрема, але не обмежуючись ними, ті, які перераховані в Carmeliet et al. Nature 407:249-257, 2000. У деяких варіантах здійснення антиангіогенний агент являє собою антагоніст ФРЕС, зокрема, але не обмежуючись ними, анти-ФРЕС антитіло (наприклад, анти-ФРЕС Fab LUCENTIS® (ранібізумаб), RTH-258 (раніше ESBA-1008, фрагмент анти-ФРЕС одноланцюгового антитіла; Novartis), або біспецифічне анти-ФРЕС антитіло (наприклад, біспецифічне анти-ФРЕС/анти-ангіопетин-2 антитіло, таке як RG-7716; Roche)), рекомбінантний злитий білок розчинного рецептора (наприклад, EYLEA® (афліберсепт)), варіант ФРЕС, фрагмент розчинного ФРЕСР, аптамери, здатний блокувати ФРЕС (наприклад, пагептаніб) або ФРЕСР, нейтралізуюче анти-ФРЕСР антитіло, низькомолекулярний інгібітор тирозинкіназ ФРЕСР, анти-ФРЕС DARPIn® (наприклад, абіципар пегол), малі інтерферуючі РНК, які інгібують експресію ФРЕС або ФРЕСР, інгібітор тирозинкінази ФРЕСР (наприклад, 4-(4-бромо-2-флуораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназолін (ZD6474), 4-(4-флуоро-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідин-1-ілпропокси)хіназолін (AZD2171), ваталаніб (PTK787), семаксамініб (SU5416; SUGEN), і SUTENT® (сунітиніб)), і їх комбінації. У деяких випадках біспецифічне анти-ФРЕС антитіло зв'язується з другою біологічною молекулою, зокрема, але не обмежуючись ними, ІЛ-1β; ІЛ-6; ІЛ-6R; ТцФР (наприклад, PDGF-BB); ангіопетин; ангіопетин-2; Tie2; S1P; інтегрини αvβ3, αvβ5, і α5β1; бетацеллюлін; апелін/APJ; еритропоетин; фактор D комплементу; ФНП-α; HtrA1; рецептор ФРЕС (наприклад, ФРЕСР1, ФРЕСР2, ФРЕСР3, мзФРЕСР, або рФРЕСР); ST-2-рецептор; і білки, генетично пов'язані з ризиком вікової макулярної дегенерації (ВМД), такі як компоненти шляху комплементу C2, фактор В, фактор Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; ІЛ-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; і TNFRSF10A. Наприклад, у деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, таке як RG-7716 або будь-яке анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, розкриті у WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант.

Інші відповідні антиангіогенні агенти, які можуть бути введені в комбінації з антитілом (наприклад, анти-ФРЕС антитілом, сконструйованим введенням цистеїну) або кон'югатом антитіла (наприклад, монодисперсним кон'югатом ГК) за винаходом для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС), включають кортикостероїди, ангіостатичні стероїди, анекортаву ацетат, ангіостатин, ендостатин, інгібітори тирозинкінази, інгібітори матричної металопротеїнази (ММР), білок-3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту, (IGFBP3), антагоністи фактора стромальних клітин (SDF-1) (наприклад, анти-SDF-1 антитіла), фактор пігментного епітелію (PEDF), гамма-секретаза, дельта-подібний ліганд-4, антагоністи інтегрину, антагоністи фактора, що індукується гіпоксією, (HIF)-1α, антагоністи протеїнкінази СК2, агенти, які інгібують стовбурові клітини (наприклад, ендотеліальні клітини-попередники), що знаходяться в місці неоваскуляризації, (наприклад, антитіло проти судинного ендотеліального кадгерину (CD-144) та/або анти-SDF-1 антитіло), та їх комбінації.

В іншому прикладі, у деяких випадках антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом може бути введений в комбінації з агентом, який має активність проти неоваскуляризації для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС), таким як протизапальний лікарський засіб, інгібітор мішені рапаміцину в клітинах ссавців (mTOR) (наприклад, рапаміцин, AFINITOR® (еверолімус), і TORISEL® (темсиролімус)), циклоспорин, антагоніст фактора некрозу пухлини (ФНП) (наприклад, анти-ФНП-α антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент (наприклад, інфліксимаб, адаліумаб, цертолізумаб пегол і голіумаб) або злитий білок розчинного рецептора (наприклад, етанерсепт)), антикомплемментний агент, нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ), або їх комбінації.

Як ще один приклад, у деяких випадках антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом може бути введений у комбінації з агентом, який є нейропротекторним і потенційно може зменшити прогресування сухої форми ВМД у вологу форму ВМД, таким як клас препаратів, званих "нейростероїдами", які включають такі препарати, як дегідроепіандростерон (ДЕА) (торгові назви: PRASTERA™ і FIDELIN®), дегідроепіандростерон-сульфат, і прегненолон-сульфат.

Будь-який відповідний терапевтичний агент проти ВМД може бути введений як додатковий терапевтичний агент у комбінації з антитілом (наприклад, анти-ФРЕС антитілом, сконструйованим введенням цистеїну) або кон'югатом антитіла (наприклад, кон'югатом монодисперсної ГК) за винаходом для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС), зокрема, але не обмежуючись цим, антагоніст ФРЕС, наприклад, анти-ФРЕС антитіло

(наприклад, LUCENTIS® (ранібізумаб), RTH-258 (що раніше називався ESBA-1008, фрагмент анти-ФРЕС одноланцюгового антитіла; Novartis), або біспецифічне анти-ФРЕС антитіло (наприклад, анти-ФРЕС/анти-ангіопоетин-2 біспецифічне антитіло, таке як RG-7716; Roche)), злитий білок розчинного рецептора ФРЕС (наприклад, EYLEA® (афліберсепт)), анти-ФРЕС

5 DARPin® (наприклад, абіципар пегол; Molecular Partners AG/Allergan), або анти-ФРЕС аптамер (наприклад, MACUGEN® (пегаптаніб натрію)); антагоніст тромбоцитарного фактора росту (ТцФР), наприклад, анти-ТцФР антитіло, анти-PDGFR антитіло (наприклад, REGN2176-3), анти-PDGFR-BB пегільований аптамер (наприклад, FOVISTA®; Ophthotech/Novartis), злитий білок розчинного рецептора PDGFR, або подвійний антагоніст ТцФР/ФРЕС (наприклад,

10 низькомолекулярний інгібітор (наприклад, DE-120 (Santen) або X-82 (TyrogeneX)) або біспецифічне анти-ТцФР/анти-ФРЕС антитіло)); VISUDYNE® (вертепорфін) у комбінації з фотодинамічною терапією; антиоксидант; антагоніст системи комплементу, наприклад, антагоніст фактора комплементу C5 (наприклад, низькомолекулярний інгібітор (наприклад, ARC-1905; Ophthotech) або анти-C5 антитіло (наприклад, LFG-316; Novartis), антагоніст

15 пропердину (наприклад, антитіло проти пропердину, наприклад, CLG-561; Alcon), або антагоніст фактора комплементу D (наприклад, антитіло проти фактора комплементу D, наприклад, лампалізумаб; Roche)); модифікатор циклу перетворень родопсину (наприклад, еміксустата гідрохлорид); скваламін (наприклад, OHR-102; Ohr Pharmaceutical); вітамінні та мінеральні добавки (наприклад, ті, які описані в дослідженні 1 (AREDS1; цинк і/або антиоксиданти) і

20 дослідженні 2 вікових захворювань очей (AREDS2; цинк, антиоксиданти, лютеїн, зеаксантин, і/або омега-3 жирні кислоти)); клітинну терапію, наприклад, NT-501 (Renexus); PH-05206388 (Pfizer), трансплантацію клітин huCNS-SC (StemCells), CNTO-2476 (Janssen), OpRegen (Cell Cure Neurosciences), або трансплантацію клітин MA09-hRPE (Ocata Therapeutics); антагоніст тканинного фактора (наприклад, hI-con1; Iconic Therapeutics); агоніст альфа-адренергічних

25 рецепторів (наприклад, бримонідину тартрат); пептидну вакцину (наприклад, S-646240; Shionogi); антагоніст бета-амілоїду (наприклад, моноклональне антитіло проти бета-амілоїду, наприклад, GSK-933776); антагоніст S1P (наприклад, анти-S1P-антитіло, наприклад, iSONEP™; Lpath Inc); антагоніст ROBO4 (наприклад, анти-ROBO4 антитіло, наприклад, DS-7080a; Daiichi Sankyo); лентивірусний вектор, що експресує ендостатин і ангіостатин (наприклад, RetinoStat); і

30 будь-які їх комбінації. У деяких випадках терапевтичні агенти проти ВМД (зокрема будь-який з попередніх терапевтичних агентів проти ВМД) можуть бути спільно складені. Наприклад, анти-PDGFR антитіло REGN2176-3 може бути спільно складено з афліберсептом (EYLEA®). У деяких випадках такий спільний препарат можна вводити в комбінації з антитілом за винаходом. У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД).

35 Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з LUCENTIS® (ранібізумабом) для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС). LUCENTIS® (ранібізумаб) може бути введений, наприклад, у дозі 0,3 мг/око або 0,5 мг/око шляхом інтравітреальної ін'єкції, наприклад, кожен місяць. У деяких випадках

40 захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД).

Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з EYLEA® (афліберсептом) для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС). EYLEA® (афліберсепт) може бути введений, наприклад, у дозі 2 мг/око шляхом

45 інтравітреальної ін'єкції, наприклад, кожні чотири тижні (Q4W), або Q4W протягом перших трьох місяців, з подальшими ін'єкціями один раз у два місяці у вигляді підтримуючої дози. У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД).

Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з MACUGEN® (пегаптанібом натрію) для лікування захворювання очей (наприклад,

50 ВМД, ДМН, ДР або ОВС). MACUGEN® (пегаптаніб натрію) можна вводити, наприклад, у дозі 0,3 мг/око шляхом інтравітреальної ін'єкції кожні шість тижнів. У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД).

Антитіло (анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з VISUDYNE® (вертепорфіном) у комбінації з фотодинамічною терапією для лікування

55 захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС). VISUDYNE® можна вводити, наприклад, шляхом внутрішньовенної інфузії у будь-якій відповідній дозі (наприклад, 6 мг/м² площі поверхні тіла) та вводити один раз на три місяці (наприклад, протягом 10 хвилин інфузії).

60 У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД).

Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з антагоністом ТцФР для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС). Ілюстративні антагоністи ТцФР, які можуть бути використані в комбінації з антитілом за винаходом включають анти-ТцФР антитіло, анти-PDGFR антитіло, низькомолекулярний інгібітор (наприклад, скваламін), анти-PDGF-B пегільований аптамер, такий як FOVISTA® (E10030; Ophthotech/Novartis), або подвійний антагоніст ТцФР/ФРЕС (наприклад, низькомолекулярний інгібітор (наприклад, DE-120 (Santen) або X-82 (TyrogeneX)) або біспецифічне анти-ТцФР/анти-ФРЕС антитіло). Наприклад, FOVISTA® можна вводити як допоміжну терапію з антитілом за винаходом. FOVISTA® можна вводити в будь-якій відповідній дозі, наприклад, від 0,1 мг/око до 2,5 мг/око, наприклад, 0,3 мг/око або 1,5 мг/око, наприклад, шляхом інтравітреальної ін'єкції, наприклад, кожні чотири тижні (Q4W). OHR-102 (офтальмологічний розчин лактату скваламіну, 0,2 %) можна вводити за допомогою очних крапель, наприклад, два рази на добу. OHR-102 можна вводити в комбінації з антагоністами ФРЕС, такими як LUCENTIS® або EYLEA®. У деяких варіантах здійснення кон'югат антитіла за винаходом можна вводити в комбінації з OHR-102, LUCENTIS®, і/або EYLEA®. У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД).

Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з RTH-258 для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС). RTH-258 можна вводити, наприклад, шляхом інтравітреальної ін'єкції або очної інфузії. Для інтравітреальної ін'єкції, RTH-258 можна вводити в будь-якій відповідній дозі (наприклад, 3 мг/ко або 6 мг/око), наприклад, один раз кожні чотири тижні (Q4W) протягом перших трьох місяців, у вигляді навантажувальної дози, з наступною ін'єкцією кожні 12 тижнів (Q12W) або кожні вісім тижнів (Q8W) у вигляді підтримуючої дози. У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД).

Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з абіципаром пеголу для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС). Абіципар пегол можна вводити, наприклад, шляхом інтравітреальної ін'єкції. Абіципар пегол можна вводити в будь-якій відповідній дозі (наприклад, 1 мг/око, 2 мг/око, 3 мг/око, 4 мг/око, або 4,2 мг/око), наприклад, один раз кожні чотири тижні (Q4W) протягом перших трьох місяців, у вигляді навантажувальної дози, з наступною ін'єкцією кожні 12 тижнів (Q12W) або кожні вісім тижнів (Q8W) у вигляді підтримуючої дози. У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД).

Будь-який відповідний терапевтичний агент проти ДМН і/або ДР можна вводити в комбінації з антитілом (наприклад, анти-ФРЕС антитілом, сконструйованим введенням цистеїну), кон'югатом антитіла (наприклад, кон'югатом монодисперсної ГК) за винаходом для лікування захворювання очей (наприклад, ВМД, ДМН, ДР або ОВС), зокрема, але не обмежуючись ними, антагоніст ФРЕС (наприклад, LUCENTIS® або EYLEA®), кортикостероїд (наприклад, кортикостероїдний імплантат (наприклад, OZURDEX® (інтравітреальний імплантат дексаметазону) або ILUVIEN® (інтравітреальний імплантат флуоцинолону ацетоніду)) або кортикостероїд, складений для введення шляхом інтравітреальної ін'єкції (наприклад, триамцинолон ацетонід)), або їх комбінації. У деяких випадках захворювання очей являє собою ДМН і/або ДР.

Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з LUCENTIS® (ранібізумабом) для лікування захворювання ДМН і/або ДР (наприклад, НПДР або ПДР). LUCENTIS® (ранібізумаб) можна вводити, наприклад, у дозі 0,3 мг/око або 0,5 мг/око шляхом інтравітреальної ін'єкції, наприклад, кожні чотири тижні (Q4W).

Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з EYLEA® (афліберсептом) для лікування захворювання ДМН і/або ДР (наприклад, НПДР або ПДР). EYLEA® (афліберсепт) можна вводити, наприклад, у дозі 2 мг/око шляхом інтравітреальної ін'єкції, наприклад, кожні чотири тижні (Q4W), або Q4W протягом перших п'яти місяців, з подальшими ін'єкціями один раз кожні вісім тижнів (Q8W) у вигляді підтримуючої дози.

Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з OZURDEX® (інтравітреальним імплантатом дексаметазону) для лікування ДМН і/або ДР. OZURDEX® можна вводити у вигляді інтравітреального імплантату з 0,7 мг дексаметазону,

який можна вводити кожні шість місяців.

Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом можна вводити в комбінації з ILUVIEN® (інтравітреальним імплантатом дексаметазону) для лікування ДМН і/або ДР. OZURDEX® можна вводити у вигляді інтравітреального імплантату з 0,19 мг фторцинолону ацетоніду, який може вивільнятися зі швидкістю 0,25 мкг/доба до близько 36 місяців.

У деяких випадках схема лікування ТАО/PRN ("лікувати і спостерігати"/в міру необхідності) або схема лікування ТАЕ (лікування з подовженням інтервалів між введеннями доз препарату) може бути використана для введення терапевтичного агента проти ВМД (наприклад, ранібізумабу або афліберсепту) у комбінації з антитілом (наприклад, анти-ФРЕС антитілом, сконструйованим введенням цистеїну) або кон'югатом антитіла (наприклад, кон'югатом монодисперсної ГК) за винаходом. Для схеми ТАО/PRN, після початкових інтравітреальних ін'єкцій кожні чотири тижні (Q4W) (як правило, протягом близько 3 місяців), суб'єкта спостерігали щомісяця або раз на місяць (або навіть через більш тривалі інтервали) з ін'єкціями, що вводяться в разі виникнення ознак активності захворювання (наприклад, зниження гостроти зору або рідини, оціненої шляхом оптичної когерентної томографії (ОКТ)). Для схеми ТАЕ суб'єкт може отримувати лікування кожні чотири тижні (Q4W), з подальшим подовженням інтервалу лікування на фіксовану кількість тижнів (наприклад, +2 тижні) для кожного наступного візиту до максимального інтервалу (наприклад, кожні 6 тижнів, кожні 8 тижнів, кожні 10 тижнів, або кожні 12 тижнів). Око (очі) можна спостерігати і обробляти при кожному візиті, навіть якщо немає ніяких ознак активності захворювання. Якщо макула стає вологою (наприклад, за ОКТ), інтервал для ін'єкцій може бути скорочений (наприклад, -2 тижнів) до тих пір, поки макула знову не стане сухою. У деяких випадках захворювання очей являє собою ВМД (наприклад, вологу форму ВМД).

Такі комбіновані терапії, зазначені раніше, охоплюють комбіноване введення (в якому два або більше терапевтичних агента включені в одну і ту ж або в окремі композиції), а також роздільне введення, і в цьому випадку, введення антитіла або кон'югату антитіла за винаходом може відбуватися до, одночасно та/або після введення додаткового терапевтичного агента або агентів. В одному варіанті здійснення введення антитіла або кон'югату антитіла, і введення додаткового терапевтичного агента відбувається кожні близько один, два, три, чотири або п'ять місяців, або кожні близько один, два або три тижні, або кожні близько одну, дві, три, чотири, п'ять або шість діб.

Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну), або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) за винаходом (і будь-який додатковий терапевтичний агент) для профілактики або лікування захворювання або патологічного стану очей можуть бути введені будь-яким підходящим способом, зокрема, але не обмежуючись цим, наприклад, окулярною, інтраокулярною, і/або інтравітреальною ін'єкцією, і/або ін'єкцією у навколосклеральну область, і/або ін'єкцією у субтенонівий простір, і/або ін'єкцією у супрахоріоїдальний простір, і/або місцевого застосування у вигляді очних крапель і/або мазі. Такі антитіла або кон'югати антитілу можуть бути доставлені за допомогою різних способів, наприклад, інтравітреально у вигляді пристрою, і/або депо, яке забезпечує повільне вивільнення сполуки в склоподібне тіло, зокрема і ті способи, які описані в посиланнях, таких як Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Jaffe, Ashton, and Pearson, editors, Taylor & Francis (March 2006). В одному прикладі пристрій може бути у вигляді міні-насоса, і/або матриці, і/або системи пасивної дифузії, і/або інкапсульованих клітин, які вивільняють сполуки протягом тривалого періоду часу (Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Jaffe, Ashton, and Pearson, editors, Taylor & Francis (March 2006). Додаткові підходи, що можуть бути використані, описані в розділі G нижче.

Композиції для окулярного, інтраокулярного або інтравітреального введення можуть бути отримані за допомогою способів і з використанням допоміжних речовин, відомих у цій галузі техніки. Важливою особливістю для ефективного лікування є правильне проникнення через око. На відміну від захворювань передньої частини ока, куди лікарські засоби можуть бути доставлені місцево, захворювання сітківки, як правило, має перевагу через більш сайт-специфічний підхід. Очні краплі і мазь рідко проникає у задню частину ока, а гематоофтальмічний бар'єр перешкоджає проникненню в очну тканину лікарських засобів що вводяться системно. Відповідно, переважний спосіб для доставки лікарських засобів для лікування захворювань сітківки, таких як ВМД і ХНВ, являє собою, як правило, пряму інтравітреальну ін'єкцію. Інтравітреальні ін'єкції зазвичай повторюють з інтервалами, які залежать від стану пацієнта, а також властивостей і періоду напіввиведення доставленого лікарського засобу. Додаткові підходи, що можуть бути використані, описані в розділі G нижче.

Кількість антитіла або кон'югату антитіла, яке буде ефективним у лікуванні конкретного

захворювання або патологічного стану очей, буде залежати від природи захворювання або патологічного стану, і може бути визначено стандартними клінічними методами. Там, де це можливо, бажано визначити криву доза-ефект фармацевтичних композицій за винаходом спочатку *in vitro*, а потім у придатних тваринних модельних системах перед тестуванням в організмі людини.

Додаткові відповідні способи введення включають парентеральне, внутрішньолегеневе та інтраназальне і, якщо необхідно для місцевої терапії, внутрішньовогнищеве введення. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревне та підшкірне введення. Введення дози можна проводити будь-яким зручним способом, наприклад, шляхом ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, частково в залежності від того, чи є введення короткочасним або постійним. У цьому документі розглядаються різні схеми дозування, зокрема, але не обмежуються ними, одноразові або багаторазові введення через часові проміжки, у вигляді одноразової дози введення та імпульсної інфузії. У деяких випадках кон'югат антитіла за винаходом можна вводити, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, інтрадермально, чре́зшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньочеревно, внутрішньовогнищеве, інтракраніально, внутрішньосуглобово, внутрішньопростатно, внутрішньоплевральне, інтратрахеально, інтратекально, інтраназально, інтравітреально, вагінально, ректально, місцево, внутрішньопухлинно, внутрішньочеревно, інтравентрикулярно, підшкірно, субкон'юнктивально, внутрішньопузирно, через слизову оболонку, інтраперикардіально, внутрішньопуповинно, інтраорбітально, перорально, місцево, трансдермально, шляхом інгаляції, шляхом ін'єкції, шляхом імплантації, шляхом інфузії, шляхом безперервної інфузії, шляхом локалізованої перфузії безпосередньо через клітини-мішені, за допомогою катетера, за допомогою лаважу, у кремах або в ліпідних композиціях.

Для профілактики або лікування захворювання підходяща доза антитіла (наприклад, анти-ФРЕС антитіла, сконструйованого введенням цистеїну) або кон'югату антитіла (наприклад, кон'югату монодисперсної ГК) за винаходом (використовуваного самостійно або в комбінації з одним або більше іншими додатковими терапевтичними засобами) буде залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, типу антитіла, тяжкості і перебігу захворювання, того, чи вводиться антитіло з профілактичною або терапевтичною метою, попередньої терапії, історії хвороби пацієнта, чутливості до антитіла та рішення лікуючого лікаря. Антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат антитіла (наприклад, кон'югат монодисперсної ГК) відповідним чином вводять пацієнту за один раз або протягом курсу лікування. Залежно від типу і ступеня тяжкості захворювання, від близько 1 мкг/кг до 15 мкг/кг (наприклад, 0,1 мкг/кг, 0,2 мкг/кг, 0,4 мкг/кг, 0,6 мкг/кг, 0,8 мкг/кг, 1 мкг/кг, 2 мкг/кг, 3 мкг/кг, 4 мкг/кг, 5 мкг/кг, 6 мкг/кг, 7 мкг/кг, 8 мкг/кг, 9 мкг/кг або 10 мкг/кг) антитіла або кон'югату антитіла може являти собою первісну передбачувану дозу для введення пацієнту, наприклад, за допомогою одного або більше окремих введень, або шляхом безперервної інфузії. У деяких варіантах здійснення використовується кількість антитіла або кон'югату антитіла становить від близько 0,01 мкг/кг до близько 45 мкг/кг, від близько 0,01 мкг/кг до близько 40 мкг/кг, від близько 0,01 мкг/кг до близько 35 мкг/кг, від близько 0,01 мкг/кг до близько 30 мкг/кг, від близько 0,01 мкг/кг до близько 25 мкг/кг, від близько 0,01 мкг/кг до близько 20 мкг/кг, від близько 0,01 мкг/кг до близько 15 мкг/кг, від близько 0,01 мкг/кг до близько 10 мкг/кг, від близько 0,01 мкг/кг до близько 5 мкг/кг, або від близько 0,01 мкг/кг до близько 1 мкг/кг. Для отримання кон'югатів антитіл, підбір дози може бути заснований на масі компонента антитіла в кон'югаті. Одна типова добова доза може знаходитися в діапазоні від близько 1 мкг/кг до 100 мкг/кг або більше в залежності від вищевказаних факторів. У разі повторних введень протягом декількох діб або більше, в залежності від стану, лікування, як правило, проводять до досягнення бажаного ступеня пригнічення симптомів захворювання.

У деяких варіантах здійснення способи можуть додатково включати додаткову терапію. Додаткова терапія може являти собою променеву терапію, хірургію, хіміотерапію, генну терапію, ДНК-терапію, вірусну терапію, РНК-терапію, імунотерапію, трансплантацію кісткового мозку, нанотерапію, терапію моноклональними антитілами або комбінацію перерахованого вище. Додаткова терапія може бути у вигляді ад'ювантної або неоад'ювантної терапії. У деяких варіантах здійснення додаткова терапія являє собою введення низькомолекулярного ферментативного інгібітору або антиметастатичного агента. У деяких варіантах здійснення додаткова терапія являє собою введення агентів, що обмежують побічні ефекти, (наприклад, агенти, призначені для зменшення виникнення та/або ступеня тяжкості побічних ефектів лікування, такі як агенти проти нудоти і т. д.). У деяких варіантах здійснення додаткова терапія являє собою променеву терапію. У деяких варіантах здійснення додаткова терапія являє собою хірургічну операцію. У деяких варіантах здійснення додаткова терапія являє собою комбінацію

променевої терапії та хірургічної операції. У деяких варіантах здійснення додаткова терапія являє собою хірургічну операцію. У деяких варіантах здійснення додаткова терапія може являти собою окреме введення одного або більше з описаних вище терапевтичних агентів.

5 Слід розуміти, що будь-який із зазначених вище складів або будь-який з терапевтичних методів можна здійснити з використанням імунокон'югату за винаходом замість або на додаток до анти-ФРЕС антитіла.

Слід розуміти, що будь-який з вищевказаних складів або будь-який з терапевтичних способів можуть бути здійснені з використанням кон'югату антитіла за винаходом (наприклад, будь-якого, описаного в цьому документі, наприклад, у розділі G нижче).

10 F. Промислові вироби

В іншому аспекті винаходу запропоновано промисловий виріб, що містить матеріали, що застосовуються для лікування та/або профілактики вищеописаних порушень. Промисловий виріб містить контейнер і етикетку або листок-вкладиш в упаковці, нанесений на або зв'язаний з контейнером. Відповідні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци, пакети 15 для розчинів для внутрішньовенного введення і т. д. Контейнери можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер містить композицію, одну або в комбінації з іншою композицією, ефективною у лікуванні, профілактиці та/або діагностуванні патологічного стану, і може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, контейнер може являти собою пакет для розчинів для внутрішньовенного введення або флакони з пробкою, яка 20 проколюється за допомогою голки для підшкірних ін'єкцій). Щонайменше один активний агент у композиції являє собою композицію антитіл (наприклад, антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну) або кон'югат такого антитіла) за винаходом. На етикетці або листку-вкладиші в упаковці зазначено, що композиція використовується для вибраного патологічного стану. Крім того, промисловий виріб може містити (а) перший 25 контейнер з композицією, яка міститься в ньому, при цьому композиція містить антитіло або композицію таких антитіл за винаходом; і (b) другий контейнер з композицією, яка міститься в ньому, при цьому композиція містить додатковий цитотоксичний або інший терапевтичний агент. Промисловий виріб у цьому варіанті здійснення винаходу може додатково містити листок-вкладиш в упаковці із зазначенням того, що композиція(ї) може бути використана для лікування 30 конкретного патологічного стану. В альтернативному або додатковому варіанті промисловий виріб може додатково містити другий (чи третій) контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буферний розчин, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWFI), фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера та розчин декстрази. Додатково можуть бути включені інші речовини, бажані з комерційної та споживчої точки зору, зокрема інші буфери, 35 розчинники, фільтри, голки та шприци.

Зрозуміло, що будь-який із зазначених вище промислових виробів може містити будь-яке з антитіл або кон'югати таких антитіл, описані в цьому документі, і/або будь-які додаткові терапевтичні агенти.

40 G. Підходи для доставки очних лікарських засобів пролонгованої дії

Винахід забезпечує композиції для лікування захворювань очей, які можуть бути використані для доставки антитіл пролонгованої дії (наприклад, анти-ФРЕС антитіла (зокрема будь-яке анти-ФРЕС антитіло, описане в цьому документі, таке як G6.31 AARR)) в око. Наприклад, винахід забезпечує кон'югати антитіл (наприклад, кон'югати монодисперсної ГК), які містять 45 анти-ФРЕС антитіло, описане в цьому документі, (наприклад, кон'югати Fab, Fab-C, або антитіла, сконструйованого введенням цистеїну, (наприклад, тіо-Fab)). Винахід також відноситься до пристроїв, які можуть бути використані для окулярного введення антитіла або кон'югату антитіла, описаного в цьому документі. Крім того, винахід забезпечує фармацевтичні композиції, які містять антитіла або кон'югати антитіл, описані в цьому документі. Ці композиції можуть бути використані в будь-якому з терапевтичних способів, описаних у цьому документі, 50 наприклад, способи лікування захворювання очей (наприклад, ВМД (наприклад, вологої форми ВМД), ДМН, ДР (наприклад, НПДР або ПДР), або ОВС (наприклад, ОЦВС або ОГВС)).

1. Кон'югати антитіл

Винахід забезпечує кон'югати антитіла, які містять антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло) і монодисперсний полімер, ковалентно приєднаний до антитіла. Антитіло (наприклад, 55 анти-ФРЕС антитіло) може бути ковалентно приєднано до монодисперсного полімеру незворотним або оборотним чином. Будь-який відповідний монодисперсний полімер може бути використаний, зокрема ті, які описані в цьому документі, або інші, відомі в цій галузі техніки.

Винахід забезпечує кон'югат антитіла, який містить антитіло і монодисперсний полімер (наприклад, монодисперсний полімер ГК), ковалентно приєднаний до антитіла. Полімер може 60 мати індекс полідисперсності (PDI), рівний близько 1,1 або нижче. Слід розуміти, що значення

PDI може ставитися до значення PDI полімеру, використовуюваного для отримання кон'югату антитіла. Наприклад, у деяких варіантах здійснення полімер має PDI від 1,0 до близько 1,1 (наприклад, від 1 до близько 1,1, від 1 до близько 1,09, від 1 до близько 1,08, від 1 до близько 1,07, від 1 до близько 1,06, від 1 до близько 1,05, від 1 до близько 1,04, від 1 до близько 1,03, від 1 до близько 1,02, від 1 до близько 1,01, від 1 до близько 1,005, від близько 1,001 до близько 1,1, від близько 1,001 до близько 1,1, від близько 1,001 до близько 1,09, від близько 1,001 до близько 1,08, від близько 1,001 до близько 1,07, від близько 1,001 до близько 1,06, від близько 1,001 до близько 1,05, від близько 1,001 до близько 1,04, від близько 1,001 до близько 1,03, від близько 1,001 до близько 1,02, від близько 1,001 до близько 1,01, від близько 1,001 до близько 1,005, від близько 1,001 до близько 1,004, від близько 1,001 до близько 1,003, від близько 1,001 до близько 1,002, від близько 1,0001 до близько 1,1, від близько 1,0001 до близько 1,09, від близько 1,0001 до близько 1,08, від близько 1,0001 до близько 1,07, від близько 1,0001 до близько 1,06, від близько 1,0001 до близько 1,05, від близько 1,0001 до близько 1,04, від близько 1,0001 до близько 1,03, від близько 1,0001 до близько 1,02, від близько 1,0001 до близько 1,01, від близько 1,0001 до близько 1,005, від близько 1,0001 до близько 1,004, від близько 1,0001 до близько 1,003, від близько 1,0001 до близько 1,002, або від близько 1,0001 до близько 1,005).

Наприклад, у деяких варіантах здійснення монодисперсний полімер (наприклад, монодисперсний полімер ГК) має PDI, рівний 1,001, близько 1,0001, близько 1,00001, близько 1,000001, близько 1,0000001, або нижче. У деяких варіантах здійснення монодисперсний полімер (наприклад, монодисперсний полімер ГК) має PDI, рівний 1,0, близько 1,001, близько 1,002, близько 1,003, близько 1,004, близько 1,005, близько 1,006, близько 1,007, близько 1,008, близько 1,009, близько 1,01, близько 1,011, близько 1,012, близько 1,013, близько 1,014, близько 1,015, близько 1,016, близько 1,017, близько 1,018, близько 1,019, близько 1,02, близько 1,021, близько 1,022, близько 1,023, близько 1,024, близько 1,025, близько 1,026, близько 1,027, близько 1,028, близько 1,029, близько 1,03, близько 1,031, близько 1,032, близько 1,033, близько 1,034, близько 1,035, близько 1,036, близько 1,037, близько 1,038, близько 1,039, близько 1,04, близько 1,041, близько 1,042, близько 1,043, близько 1,044, близько 1,045, близько 1,046, близько 1,047, близько 1,048, близько 1,049, близько 1,05, близько 1,051, близько 1,052, близько 1,053, близько 1,054, близько 1,055, близько 1,056, близько 1,057, близько 1,058, близько 1,059, близько 1,06, близько 1,061, близько 1,062, близько 1,063, близько 1,064, близько 1,065, близько 1,066, близько 1,067, близько 1,068, близько 1,069, близько 1,07, близько 1,071, близько 1,072, близько 1,073, близько 1,074, близько 1,075, близько 1,076, близько 1,077, близько 1,078, близько 1,079, близько 1,08, близько 1,081, близько 1,082, близько 1,083, близько 1,084, близько 1,085, близько 1,086, близько 1,087, близько 1,088, близько 1,089, близько 1,09, близько 1,091, близько 1,092, близько 1,093, близько 1,094, близько 1,095, близько 1,096, близько 1,097, близько 1,098, близько 1,099, або близько 1,1. У деяких варіантах здійснення полімер (наприклад, полімер ГК) має PDI, рівний близько 1,001.

Монодисперсний полімер може являти собою гідрофільний полімер або гідрофобний полімер. Слід розуміти, що гідрофільний полімер може являти собою розчинний у воді полімер. Будь-який відповідний гідрофільний полімер може бути використаний, наприклад, гідрофільний полімер описаний в публікації міжнародної патентної заявки № WO 2011/066417. и/или Pelegri-O'Day et al. J. Am. Chem. Soc. 136:14323-14332, 2014, які включені в цей документ шляхом посилання у всій їх повноті. Ілюстративні необмежуючі гідрофільні полімери, які можуть бути використані, включають гіалуронову кислоту, (ГК), поліетиленгліколь (ПЕГ; також відомий як полі(етиленгліколь)) (наприклад, лінійний ПЕГ, розгалужений ПЕГ, гребенеподібний ПЕГ, і дендритний ПЕГ), полі(етиленоксид)-ко-(метилен-етиленоксид)], полі(полі(етиленгліколь) метиловий етер метакрилат) (pPEGMA), агарозу, альгінат, каррагінани, карбоксиметилцелюлозу, целюлозу, похідні целюлози, хітозан, хондроїтинсульфат, колаген, дерматансульфат, декстран, сульфат декстрану, фібрин, фібриноген, фібронектин, фукоїдан, желатин, глікозаміноглікани (GAG), глікополімер, гепарин, гепарансульфат, високорозгалужений полісахарид (наприклад, дендримеру галактози), кератансульфат, метилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу (HPMC), полі(N-(2-гідроксипропіл)метакриламід) (pHPMA), пектини, похідні пектину, пентозану полісульфат, крохмаль, гідроксилетилкрохмаль (HES), стирол, вітронектин, полі(акрилову кислоту), полі(метакрилову кислоту), полі(акриламід), полі(акрилову кислоту), полі(аміни), полі(амінокислоти), полі(карбоксибетаїн) (PCB), поліелектроліти, полі(глутамінову кислоту) (PGA), полі(гліцерин) (PG) (наприклад, лінійний, середньофункціональний, гіперрозгалужений або лінійний гіперрозгалужений PG), полі(малеїнову кислоту), полі(2-оксазолін) (POZ), полі(2-етил-2-оксазолін, полісіалову кислоту

(PSA), полістирол, похідні полістиролу (наприклад, заряджені похідні полістиролу), полі(стиролсульфонат-ко-PEGMA), полівінілпіролідон (PVP), полі(N-акрилоїлморфолін) (pNACM), і їх кополімери. У деяких випадках полімер являє собою гідрофобний полімер, наприклад, полілактид ко-гліколід (PLGA), полілактид (PLA), і полігліколід (PGA). Полімер може

бути біорозкладаним та/або біосумісним. У конкретних варіантах здійснення полімер являє собою ГК.

Як приклад монодисперсний полімер (наприклад, полімер ГК) може містити будь-яку відповідну кількість мономерів, наприклад, від 2 до близько 1×10^4 мономерів (наприклад, близько 10, близько 50, близько 100, близько 200, близько 300, близько 400, близько 500, близько 600, близько 700, близько 800, близько 900, близько 1000, близько 2000, близько 3000, близько 4000, близько 5000, близько 6000, близько 7000, близько 8000, близько 9000 або близько 1×10^4 мономерів), або більше. Наприклад, полімер (наприклад, полімер ГК) може містити від близько 50 до близько 250 мономерів, від близько 50 до близько 500 мономерів, від близько 50 до близько 1000 мономерів, від близько 50 до близько 2000 мономерів, від близько 50 до близько 3000 мономерів, від близько 50 до близько 4000 мономерів, від близько 50 до близько 5000 мономерів, від близько 50 до близько 6000 мономерів, від близько 50 до близько 7000 мономерів, від близько 50 до близько 8000 мономерів, від близько 50 до близько 9000 мономерів, від близько 50 до близько 10000 мономерів, від близько 100 до близько 250 мономерів, від близько 100 до близько 500 мономерів, від близько 100 до близько 1000 мономерів, від близько 100 до близько 2000 мономерів, від близько 100 до близько 3000 мономерів, від близько 100 до близько 4000 мономерів, від близько 100 до близько 5000 мономерів, від близько 100 до близько 6000 мономерів, від близько 100 до близько 7000 мономерів, від близько 100 до близько 8000 мономерів, від близько 100 до близько 9000 мономерів, від близько 100 до близько 10000 мономерів, від близько 250 до близько 500 мономерів, від близько 250 до близько 1000 мономерів, від близько 250 до близько 2000 мономерів, від близько 250 до близько 3000 мономерів, від близько 250 до близько 4000 мономерів, від близько 250 до близько 5000 мономерів, від близько 250 до близько 6000 мономерів, від близько 250 до близько 7000 мономерів, від близько 250 до близько 8000 мономерів, від близько 250 до близько 9000 мономерів, від близько 250 до близько 10000 мономерів, від близько 500 до близько 1000 мономерів, від близько 500 до близько 2000 мономерів, від близько 500 до близько 3000 мономерів, від близько 500 до близько 4000 мономерів, від близько 500 до близько 5000 мономерів, від близько 500 до близько 6000 мономерів, від близько 500 до близько 7000 мономерів, від близько 500 до близько 8000 мономерів, від близько 500 до близько 9000 мономерів, або від близько 500 до близько 10000 мономерів. У деяких випадках полімер (наприклад, полімер ГК) може містити близько 500 мономерів.

Винахід забезпечує кон'югат антитіла, який містить антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, таке як G6.31 AARR) ковалентно приєднане до монодисперсного полімеру ГК. Такі кон'югати антитіл іноді згадуються в цьому документі як "монодисперсні кон'югати ГК". Монодисперсний полімер ГК може мати індекс полідисперсності (PDI), рівний близько 1,1 або нижче. Наприклад, у деяких варіантах здійснення монодисперсний полімер ГК має PDI від 1,0 до близько 1,1 (наприклад, від 1 до близько 1,1, від 1 до близько 1,09, від 1 до близько 1,08, від 1 до близько 1,07, від 1 до близько 1,06, від 1 до близько 1,05, від 1 до близько 1,04, від 1 до близько 1,03, від 1 до близько 1,02, від 1 до близько 1,01, від 1 до близько 1,005, від близько 1,001 до близько 1,1, від близько 1,001 до близько 1,1, від близько 1,001 до близько 1,09, від близько 1,001 до близько 1,08, від близько 1,001 до близько 1,07, від близько 1,001 до близько 1,06, від близько 1,001 до близько 1,05, від близько 1,001 до близько 1,04, від близько 1,001 до близько 1,03, від близько 1,001 до близько 1,02, від близько 1,001 до близько 1,01, від близько 1,001 до близько 1,005, від близько 1,001 до близько 1,004, від близько 1,001 до близько 1,003, від близько 1,001 до близько 1,002, від близько 1,0001 до близько 1,1, від близько 1,0001 до близько 1,09, від близько 1,0001 до близько 1,08, від близько 1,0001 до близько 1,07, від близько 1,0001 до близько 1,06, від близько 1,0001 до близько 1,05, від близько 1,0001 до близько 1,04, від близько 1,0001 до близько 1,03, від близько 1,0001 до близько 1,02, від близько 1,0001 до близько 1,01, від близько 1,0001 до близько 1,005, від близько 1,0001 до близько 1,004, від близько 1,0001 до близько 1,003, від близько 1,0001 до близько 1,002, або від близько 1,0001 до близько 1,005).

Наприклад, у деяких варіантах здійснення монодисперсний полімер ГК має PDI, рівний 1,001, близько 1,0001, близько 1,00001, близько 1,000001, близько 1,0000001, або нижче. У деяких варіантах здійснення монодисперсний полімер ГК має PDI, рівний 1,0, близько 1,001, близько 1,002, близько 1,003, близько 1,004, близько 1,005, близько 1,006, близько 1,007,

5	близько 1,008, близько 1,009, близько 1,01, близько 1,011, близько 1,012, близько 1,013,
	близько 1,014, близько 1,015, близько 1,016, близько 1,017, близько 1,018, близько 1,019,
	близько 1,02, близько 1,021, близько 1,022, близько 1,023, близько 1,024, близько 1,025,
	близько 1,026, близько 1,027, близько 1,028, близько 1,029, близько 1,03, близько 1,031,
	близько 1,032, близько 1,033, близько 1,034, близько 1,035, близько 1,036, близько 1,037,
	близько 1,038, близько 1,039, близько 1,04, близько 1,041, близько 1,042, близько 1,043,
	близько 1,044, близько 1,045, близько 1,046, близько 1,047, близько 1,048, близько 1,049,
10	близько 1,05, близько 1,051, близько 1,052, близько 1,053, близько 1,054, близько 1,055,
	близько 1,056, близько 1,057, близько 1,058, близько 1,059, близько 1,06, близько 1,061,
	близько 1,062, близько 1,063, близько 1,064, близько 1,065, близько 1,066, близько 1,067,
	близько 1,068, близько 1,069, близько 1,07, близько 1,071, близько 1,072, близько 1,073,
	близько 1,074, близько 1,075, близько 1,076, близько 1,077, близько 1,078, близько 1,079,
	близько 1,08, близько 1,081, близько 1,082, близько 1,083, близько 1,084, близько 1,085,
	близько 1,086, близько 1,087, близько 1,088, близько 1,089, близько 1,09, близько 1,091,
15	близько 1,092, близько 1,093, близько 1,094, близько 1,095, близько 1,096, близько 1,097,
	близько 1,098, близько 1,099, або близько 1,1. У деяких варіантах здійснення монодисперсний полімер ГК має PDI, рівний близько 1,001.

[illegible]

У деяких випадках монодисперсний полімер ГК має молекулярну масу від близько 25 кДа до близько 500 кДа (наприклад, від близько 25 кДа до близько 500 кДа, від близько 25 кДа до близько 450 кДа, від близько 25 кДа до близько 400 кДа, від близько 25 кДа до близько 350 кДа, від близько 25 кДа до близько 300 кДа, від близько 25 кДа до близько 300 кДа, від близько 25 кДа до близько 250 кДа, від близько 25 кДа до близько 200 кДа, від близько 25 кДа до близько 150 кДа, від близько 25 кДа до близько 100 кДа, від близько 25 кДа до близько 50 кДа, від близько 40 кДа до близько 500 кДа, від близько 40 кДа до близько 450 кДа, від близько 40 кДа до близько 400 кДа, від близько 40 кДа до близько 350 кДа, від близько 40 кДа до близько 300

кДа, від близько 40 кДа до близько 300 кДа, від близько 40 кДа до близько 250 кДа, від близько 40 кДа до близько 200 кДа, від близько 40 кДа до близько 150 кДа, від близько 40 кДа до близько 100 кДа, від близько 40 кДа до близько 50 кДа, від близько 50 кДа до близько 500 кДа, від близько 50 кДа до близько 450 кДа, від близько 50 кДа до близько 400 кДа, від близько 50 кДа до близько 350 кДа, від близько 50 кДа до близько 300 кДа, від близько 50 кДа до близько 250 кДа, від близько 50 кДа до близько 200 кДа, від близько 50 кДа до близько 150 кДа, від близько 50 кДа до близько 100 кДа, від близько 50 кДа до близько 75 кДа, від близько 100 кДа до близько 500 кДа, від близько 100 кДа до близько 450 кДа, від близько 100 кДа до близько 400 кДа, від близько 100 кДа до близько 350 кДа, від близько 100 кДа до близько 300 кДа, від близько 100 кДа до близько 250 кДа, від близько 100 кДа до близько 200 кДа, від близько 100 кДа до близько 150 кДа, від близько 150 кДа до близько 500 кДа, від близько 150 кДа до близько 450 кДа, від близько 150 кДа до близько 400 кДа, від близько 150 кДа до близько 350 кДа, від близько 150 кДа до близько 300 кДа, від близько 150 кДа до близько 250 кДа, від близько 150 кДа до близько 200 кДа, від близько 175 кДа до близько 500 кДа, від близько 175 кДа до близько 450 кДа, від близько 175 кДа до близько 400 кДа, від близько 175 кДа до близько 350 кДа, від близько 175 кДа до близько 300 кДа, від близько 175 кДа до близько 250 кДа, від близько 175 кДа до близько 225 кДа, від близько 200 кДа до близько 500 кДа, від близько 200 кДа до близько 450 кДа, від близько 200 кДа до близько 400 кДа, від близько 200 кДа до близько 350 кДа, від близько 200 кДа до близько 300 кДа, від близько 200 кДа до близько 250 кДа, або від близько 200 кДа до близько 225 кДа).

У деяких випадках монодисперсний полімер ГК має молекулярну масу від близько 100 кДа до близько 250 кДа (наприклад, близько 100 кДа, близько 110 кДа, близько 120 кДа, близько 130 кДа, близько 140 кДа, близько 150 кДа, близько 160 кДа, близько 170 кДа, близько 180 кДа, близько 190 кДа, близько 200 кДа, близько 210 кДа, близько 220 кДа, близько 230 кДа, близько 240 кДа, або близько 250 кДа). У конкретних випадках полімер ГК має молекулярну масу близько 200 кДа.

Будь-яка з попередніх молекулярних мас може являти собою середньоважову молекулярну масу (також відомої як середньомасова молекулярна маса).

У деяких випадках будь-який з попередніх монодисперсних полімерів ГК є лінійним, тобто, не є перехресно-зшитим.

В інших випадках винахід забезпечує кон'югат антитіла, який містить антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, таке як G6.31 AARR) ковалентно приєднане до монодисперсного полімеру ПЕГ. Такі кон'югати антитіл у цьому документі іноді називають як "кон'югати ПЕГ". Може бути використаний будь-який відповідний монодисперсний полімер ПЕГ. Слід розуміти, що монодисперсні полімери ПЕГ можуть мати різні значення PDI у порівнянні з монодисперсними полімерами ГК. Так, наприклад, комерційно доступні полімери ПЕГ можуть мати PDI нижче 1,1; таким чином, монодисперсний полімер ПЕГ буде визначатися іншим діапазоном значень PDI у порівнянні з монодисперсним полімером ГК. Наприклад, монодисперсний полімер ПЕГ може мати PDI від близько 1 до близько 1,02 (наприклад, PDI, рівний 1, близько 1,001, близько 1,002, близько 1,003, близько 1,004, близько 1,005, близько 1,006, близько 1,007, близько 1,008, близько 1,009, близько 1,01, близько 1,011, близько 1,012, близько 1,013, близько 1,014, близько 1,015, близько 1,016, близько 1,017, близько 1,018, близько 1,019, або близько 1,02). ПЕГ може являти собою розгалужений ПЕГ, зіркоподібний ПЕГ, або гребенеподібний ПЕГ. Полімер ПЕГ може являти собою, наприклад, тетрамер ПЕГ, гексамер ПЕГ, або октамер ПЕГ. У деяких випадках кон'югат антитіла містить анти-ФРЕС антитіло (наприклад, анти-ФРЕС антитіло, описане в цьому документі, таке як G6.31 AARR), ковалентно приєднане до дендримеру ПЕГ. Полімери ПЕГ є комерційно доступними, наприклад, від JenKem Technology, Quanta BioDesign, NOF America Corporation та інших виробників.

У деяких випадках монодисперсний полімер ПЕГ має молекулярну масу від близько 1 кДа до близько 500 кДа (наприклад, від близько 1 кДа до близько 500 кДа, від близько 1 кДа до близько 450 кДа, від близько 1 кДа до близько 400 кДа, від близько 1 кДа до близько 350 кДа, від близько 1 кДа до близько 300 кДа, від близько 1 кДа до близько 250 кДа, від близько 1 кДа до близько 200 кДа, від близько 1 кДа до близько 150 кДа, від близько 1 кДа до близько 100 кДа, від близько 1 кДа до близько 50 кДа, від близько 10 кДа до близько 500 кДа, від близько 10 кДа до близько 450 кДа, від близько 10 кДа до близько 400 кДа, від близько 10 кДа до близько 350 кДа, від близько 10 кДа до близько 300 кДа, від близько 10 кДа до близько 250 кДа, від близько 10 кДа до близько 200 кДа, від близько 10 кДа до близько 150 кДа, від близько 10 кДа до близько 100 кДа,

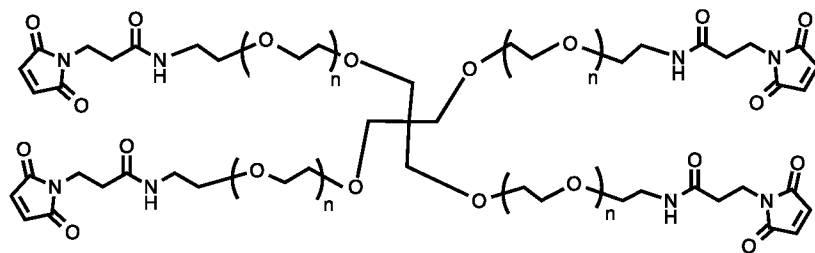
від близько 10 кДа до близько 50 кДа, від близько 20 кДа до близько 500 кДа, від близько 20 кДа до близько 450 кДа, від близько 20 кДа до близько 400 кДа, від близько 20 кДа до близько 350 кДа, від близько 20 кДа до близько 300 кДа, від близько 20 кДа до близько 300 кДа, від близько 20 кДа до близько 250 кДа, від близько 20 кДа до близько 200 кДа, від близько 20 кДа до близько 150 кДа, від близько 20 кДа до близько 100 кДа, від близько 20 кДа до близько 75 кДа, від близько 30 кДа до близько 500 кДа, від близько 30 кДа до близько 450 кДа, від близько 30 кДа до близько 400 кДа, від близько 30 кДа до близько 350 кДа, від близько 30 кДа до близько 300 кДа, від близько 30 кДа до близько 300 кДа, від близько 30 кДа до близько 250 кДа, від близько 30 кДа до близько 200 кДа, від близько 30 кДа до близько 150 кДа, від близько 40 кДа до близько 500 кДа, від близько 40 кДа до близько 450 кДа, від близько 40 кДа до близько 400 кДа, від близько 40 кДа до близько 350 кДа, від близько 40 кДа до близько 300 кДа, від близько 40 кДа до близько 300 кДа, від близько 40 кДа до близько 250 кДа, від близько 40 кДа до близько 200 кДа, від близько 50 кДа до близько 500 кДа, від близько 50 кДа до близько 450 кДа, від близько 50 кДа до близько 400 кДа, від близько 50 кДа до близько 350 кДа, від близько 50 кДа до близько 300 кДа, від близько 50 кДа до близько 225 кДа).

У деяких випадках монодисперсний полімер ПЕГ має молекулярну масу від близько 5 кДа до близько 250 кДа (наприклад, близько 1 кДа, близько 5 кДа, близько 10 кДа, близько 15 кДа, близько 20 кДа, близько 25 кДа, близько 30 кДа, близько 35 кДа, близько 40 кДа, близько 50 кДа, близько 60 кДа, близько 70 кДа, близько 80 кДа, близько 90 кДа, 100 кДа, близько 110 кДа, близько 120 кДа, близько 130 кДа, близько 140 кДа, близько 150 кДа, близько 160 кДа, близько 170 кДа, близько 180 кДа, близько 190 кДа, близько 200 кДа, близько 210 кДа, близько 220 кДа, близько 230 кДа, близько 240 кДа, або близько 250 кДа). У конкретних випадках полімер ПЕГ має молекулярну масу близько 20 кДа. В інших випадках полімер ПЕГ має молекулярну масу близько 40 кДа.

Будь-яка з попередніх молекулярних мас може являти собою середньовагову молекулярну масу (також відомої як середньомасова молекулярна маса).

У деяких випадках монодисперсний полімер ПЕГ являє собою тетрамер ПЕГ. Тетрамери ПЕГ є комерційно доступними, наприклад, від OF America SUNBRIGHT® PTE-400MA, PTE-200MA, PTE-100MA, і JenKem Technology USA 4-плечовий ПЕГ-малеїмід (кат. №. 4ARM-MAL). У деяких випадках тетрамер ПЕГ має ядро пентаеритриту. Наприклад, у деяких випадках тетрамер ПЕГ включає структуру формули (I), де n є незалежно один від одного будь-яким підходящим цілим числом:

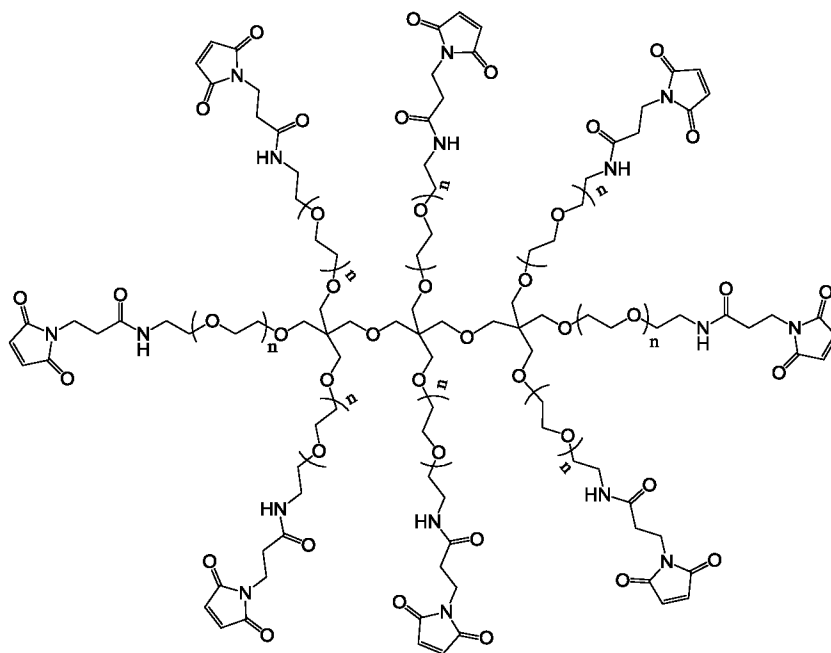
Формула I:



В іншому прикладі, у деяких випадках монодисперсний полімер ПЕГ являє собою гексамер ПЕГ. Гексамери ПЕГ є комерційно доступними, наприклад, від JenKem Technology USA 6-плечовий ПЕГ-амін (кат. № 6ARM(DP)-NH₂HCl), або гексамери ПЕГ від Quanta BioDesign. У деяких випадках гексамери ПЕГ містять ядро дипентаеритриту.

У деяких випадках монодисперсний полімер ПЕГ являє собою октамер ПЕГ. Октамер ПЕГ є комерційно доступними, наприклад, від серій NOF America SUNBRIGHT® HGEO або від JenKem Technology USA 8-плечовий ПЕГ-малеїмід (кат. № 8ARM (TP) -MAL). У деяких випадках октамер ПЕГ може містити ядро трипентаеритриту. Наприклад, у деяких випадках октамер ПЕГ включає структуру формули (II), де n є незалежно один від одного будь-яким підходящим цілим числом:

Формула II:



У ще одному прикладі, у деяких випадках октамер ПЕГ містить ядро трипентаеритриту.

Слід розуміти, що будь-який відповідний підхід до кон'югації, зокрема ті, які описані в цьому документі, і інші, відомі в цій галузі техніки, можуть бути використані для кон'югації анти-ФРЕС антитіла за винаходом з монодисперсним полімером. Наприклад, монодисперсний полімер може бути кон'югований з будь-якою відповідною функціональною групою білка, зокрема первинною аміногрупою, карбоксильною групою, сульфгідрильною групою, або карбонільною групою. Будь-яка підходяща хімічно реактивна група може бути використана для націлювання на функціональну групу білка, наприклад, карбодімід (наприклад, EDC), NHS естер, імідоестер, пентафлуорофеніловий естер, гідроксиметил фосфін, малеїмід, галогенацетил (наприклад, бромоацетил або йодоацетил), піридилдисульфід, тіосульфонат, вінілсульфон, гідразин, алкоксиамін, діазирин, арил азид, ізоціанати, або інші, відомі в цій галузі техніки. Див., наприклад, Hermanson, Bioconjugate Techniques, 3rd Edition, 2013. У конкретних варіантах здійснення ГК (наприклад, монодисперсний ГК) модифікують з використанням малеїмідних груп (ГК-малеїмід), і друге, антитіло, яке містить вільний тіол на цистеїні (наприклад, Fab-C або цистеїновий варіант (наприклад, THIOMAB™ або tio-Fab)) приводять у контакт з ГК-малеїмідом з утворенням ковалентних ГК-Fab кон'югатів, наприклад, як описано в Прикладі 1.

Будь-який з попередніх кон'югатів антитіла може мати гідродинамічний радіус від близько 5 нм до близько 200 нм (наприклад, близько 5 нм, близько 10 нм, близько 20 нм, близько 30 нм, близько 40 нм, близько 50 нм, близько 60 нм, близько 70 нм, близько 80 нм, близько 90 нм, близько 100 нм, близько 110 нм, близько 120 нм, близько 130 нм, близько 140 нм, близько 150 нм, близько 160 нм, близько 170 нм, близько 180 нм, близько 190 нм або близько 200 нм). У деяких випадках кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус від близько 5 нм до близько 150 нм (наприклад, близько 5 нм, близько 10 нм, близько 20 нм, близько 30 нм, близько 40 нм, близько 50 нм, близько 60 нм, близько 70 нм, близько 80 нм, близько 90 нм, близько 100 нм, близько 110 нм, близько 120 нм, близько 130 нм, близько 140 нм або 150 нм). У деяких випадках кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус від близько 5 нм до близько 100 нм (наприклад, близько 5 нм, близько 10 нм, близько 20 нм, близько 30 нм, близько 40 нм, близько 50 нм, близько 60 нм, близько 70 нм, близько 80 нм, близько 90 нм або близько 100 нм). У деяких випадках кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус від близько 5 нм до близько 60 нм (наприклад, близько 5 нм, близько 10 нм, близько 20 нм, близько 30 нм, близько 40 нм, близько 50 нм, або близько 60 нм). У деяких випадках кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус від близько 25 нм до близько 35 нм (наприклад, близько 25 нм, близько 26 нм, близько 27 нм, близько 28 нм, близько 29 нм, близько 30 нм, близько 31 нм, близько 32 нм, близько 33 нм, близько 34 нм або близько 35 нм). У деяких випадках гідродинамічний радіус становить близько 28 нм.

У деяких випадках кон'югат антитіла має гідродинамічний радіус від близько 10 нм до близько 200 нм, від близько 10 нм до близько 180 нм, від близько 10 нм до близько 160 нм, від близько 10 нм до близько 140 нм, від близько 10 нм до близько 120 нм, від близько 10 нм до

близько 100 нм, від близько 10 нм до близько 80 нм, від близько 10 нм до близько 60 нм, від близько 10 нм до близько 50 нм, від близько 10 нм до близько 40 нм, від близько 10 нм до близько 30 нм, від близько 20 нм до близько 200 нм, від близько 20 нм до близько 180 нм, від близько 20 нм до близько 160 нм, від близько 20 нм до близько 140 нм, від близько 20 нм до близько 120 нм, від близько 20 нм до близько 100 нм, від близько 20 нм до близько 80 нм, від близько 20 нм до близько 60 нм, від близько 20 нм до близько 50 нм, від близько 20 нм до близько 40 нм, від близько 20 нм до близько 30 нм, від близько 30 нм до близько 200 нм, від близько 30 нм до близько 180 нм, від близько 30 нм до близько 160 нм, від близько 30 нм до близько 140 нм, від близько 30 нм до близько 120 нм, від близько 30 нм до близько 100 нм, від близько 30 нм до близько 80 нм, від близько 30 нм до близько 60 нм, від близько 30 нм до близько 40 нм, від близько 40 нм до близько 200 нм, від близько 40 нм до близько 180 нм, від близько 40 нм до близько 160 нм, від близько 40 нм до близько 140 нм, від близько 40 нм до близько 120 нм, від близько 40 нм до близько 100 нм, від близько 40 нм до близько 80 нм, від близько 40 нм до близько 60 нм, від близько 40 нм до близько 50 нм, від близько 50 нм до близько 200 нм, від близько 50 нм до близько 180 нм, від близько 50 нм до близько 160 нм, від близько 50 нм до близько 140 нм, від близько 50 нм до близько 120 нм, від близько 50 нм до близько 100 нм, від близько 50 нм до близько 80 нм, від близько 50 нм до близько 60 нм, від близько 60 нм до близько 200 нм, від близько 60 нм до близько 180 нм, від близько 60 нм до близько 160 нм, від близько 60 нм до близько 140 нм, від близько 60 нм до близько 120 нм, від близько 60 нм до близько 100 нм, або від близько 60 нм до близько 80 нм.

У будь-якому з попередніх кон'югатів антитіл, антитіло може являти собою фрагмент антитіла, яке зв'язується з ФРЕС, наприклад, фрагмент анти-ФРЕС антитіла, описаного в цьому документі, яке зв'язується з ФРЕС. У деяких випадках анти-ФРЕС антитіло являє собою анти-ФРЕС антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, як описано в цьому документі (див., наприклад, Розділ 1(8)(d) вище). У деяких випадках фрагмент антитіла вибирають з групи, що складається з фрагментів Fab, Fab', Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, і (Fab')₂. В особливих випадках, фрагмент антитіла являє собою Fab, Fab', або Fab-C. У деяких випадках фрагмент антитіла являє собою Fab-C.

Будь-який з попередніх кон'югатів антитіл може мати період напіввиведення з ока, який збільшується в порівнянні з еталонним антитілом, яке приєднане ковалентно до полімеру (наприклад, гідрофільного полімеру). У деяких випадках період напіввиведення з ока збільшується щонайменше у близько 2 рази (наприклад, у близько 2 рази, близько 3 рази, близько 4 рази, близько 5 разів, близько 6 разів, близько 7 разів, близько 8 разів, близько 9 разів, близько 10 разів, близько 12 разів, близько 14 разів, близько 16 разів, близько 18 разів, близько 20 разів або більше) по відношенню до еталонного антитіла. У деяких випадках період напіввиведення з ока збільшується щонайменше у близько 4 рази по відношенню до еталонного антитіла. У деяких випадках період напіввиведення з ока являє собою період виведення із склоподібного тіла. У деяких випадках еталонне антитіло є ідентичним антитілу кон'югату антитіла. У деяких випадках еталонне антитіло є неідентичним антитілу кон'югату антитіла.

Будь-який з попередніх кон'югатів антитіл може мати кліренс, який знижується в порівнянні з еталонним антитілом, яке приєднане ковалентно до полімеру (наприклад, гідрофільного полімеру). У деяких випадках кліренс знижується щонайменше в близько 2 рази (наприклад, у близько 2 рази, близько 3 рази, близько 4 рази, близько 5 разів, близько 6 разів, близько 7 разів, близько 8 разів, близько 9 разів, близько 10 раз, близько 12 разів, близько 14 разів, близько 16 разів, близько 18 разів, близько 20 разів або більше) по відношенню до еталонного антитіла. У деяких випадках кліренс знижується щонайменше в близько 4 рази по відношенню до еталонного антитіла. У деяких випадках кліренс являє собою кліренс із склоподібного тіла. У деяких випадках еталонне антитіло є ідентичним антитілу кон'югату антитіла. У деяких випадках еталонне антитіло є неідентичним антитілу кон'югату антитіла.

У деяких випадках період часу між двома інтраокулярними ін'єкціями (наприклад, інтравітреальними ін'єкціями) будь-якого з попередніх кон'югатів антитіл (наприклад, кон'югатів ГК) становить щонайменше 1 місяць, наприклад, щонайменше 1 місяць, щонайменше 5 тижнів, щонайменше 6 тижнів, щонайменше 7 тижнів, щонайменше 8 тижнів, щонайменше 9 тижнів, щонайменше 10 тижнів, щонайменше 11 тижнів, щонайменше 12 тижнів, щонайменше 13 тижнів, щонайменше 14 тижнів, щонайменше 15 тижнів, щонайменше 16 тижнів, щонайменше 20 тижнів, щонайменше 24 тижні, щонайменше 28 тижнів, щонайменше 32 тижні, щонайменше 36 тижнів, щонайменше 40 тижнів, щонайменше 44 тижні, щонайменше 48 тижнів, щонайменше 52 тижні або більше. У деяких випадках максимальний період між двома інтраокулярними ін'єкціями становить не більше ніж чотири роки, наприклад, не більше ніж три роки, не більше

ніж два роки, або не більше ніж один рік. Кон'югат антитіла можна вводити, наприклад, кожні два-дванадцять місяців, наприклад, кожні чотири-десять місяців. У деяких випадках кон'югат антитіла вводять кожні шість місяців.

Цей винахід також забезпечує композиції (наприклад, фармацевтичні композиції), які містять
 5 будь-які з кон'югатів антитіл, описаних вище. У деяких варіантах здійснення композиція містить одну або більше додаткових сполук. У певних варіантах здійснення додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, вибраною з групи, що складається з: ІЛ-1 β ; ІЛ-6; ІЛ-6R; ТцФР; ангіопоетину; ангіопоетину-2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора D комплементу; ФНП- α ; HtrA1; рецептора ФРЕС; ST-2-рецептора; і білків, генетично пов'язаних з ризиком вікової макулярної дегенерації (ВМД), таких як компоненти шляху комплементу C2, фактор В, фактор Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; інтерлейкіна-8 (ІЛ-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення додаткова сполука являє собою
 10 антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. Наприклад, у деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, таке як RG-7716 або будь-яке анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, розкрите у WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант. В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою анти-ІЛ-6 антитіло, наприклад EBI-031 (Eleven Biotereutics; див., наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT[®]), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсилімомаб, герилізмумаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, або його варіант. У ще одному прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою анти-ІЛ-6R антитіло, наприклад тоцилізумаб (ACTEMRA[®]) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237, або його варіант.

Крім того, винахід забезпечує композиції (наприклад, фармацевтичні композиції), які містять
 25 будь-який з кон'югатів антитіл, описаних вище, і додатковий антагоніст ФРЕС.

2. Пристрої

Будь-яке з антитіл (наприклад, анти-ФРЕС антитіл, сконструйованих введенням цистеїну) або кон'югатів антитіл (наприклад, кон'югатів монодисперсної ГК), описаних у цьому документі, може бути введено в око за допомогою пристрою доставки, що імплантується. Пристрій
 30 доставки, що імплантується, являє собою багаторазовий пристрій, що імплантується, який може вивільняти терапевтичний агент (наприклад, кон'югат анти-ФРЕС антитіла) протягом декількох місяців (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 або більше місяців). Ілюстративні пристрої доставки, що імплантуються, які можуть бути використані, включають такі від ForSight Labs, LLC і/або ForSight VISION4, наприклад, як описано в публікаціях міжнародних патентних заявок №№ WO 2010/088548, WO2015 / 085234, WO 2013/116061, WO 2012 / 019176, WO 2013/040247, WO 2012/019047 і, які включені в цей документ шляхом посилання у всій їх повноті.

Наприклад, винахід забезпечує пристрій доставки, що імплантується, який включає резервуари, що містять будь-яке з антитіл або кон'югатів антитіл, описаних у цьому документі.
 40 Пристрій доставки, що імплантується, може додатково містити проксимальну область, трубчасте тіло, з'єднане з проксимальною ділянкою у комунікаційному середовищі з резервуаром, і одну або більше точок у комунікації за текучим середовищем з резервуаром, і виконані з можливістю вивільнення композиції в око. Трубчастий корпус може мати зовнішній діаметр, виконаний з можливістю бути вставленими через розріз або отвір в оці, що дорівнює
 45 близько 0,5 мм або менше. Пристрій може мати розмір від близько 1 мм до близько 15 мм в довжину (наприклад, близько 1 мм, близько 2 мм, близько 4 мм, близько 5 мм, близько 6 мм, близько 7 мм, близько 9 мм, близько 11 мм, близько 13 мм, або близько 15 мм у довжину). Резервуар може мати будь-який відповідний об'єм. У деяких випадках резервуар має об'єм від близько 1 мкл до близько 100 мкл (наприклад, близько 1 мкл, близько 5 мкл, близько 10 мкл,
 50 близько 20 мкл, близько 50 мкл, близько 75 мкл або близько 100 мкл). Цей пристрій або його складові частини можуть бути виготовлені з будь-якого відповідного матеріалу, наприклад, поліімиду.

У деяких випадках пристрій доставки, що імплантується, містить резервуар, що містить
 55 будь-яке з антитіл або кон'югатів антитіл, описаних в цьому документі, і одну або більше додаткових сполук. У певних варіантах здійснення додаткова сполука зв'язується з другою біологічною молекулою, вибраною з групи, що складається з ІЛ-1 β ; ІЛ-6; ІЛ-6R; ТцФР; ангіопоетину; ангіопоетину-2; Tie2; S1P; інтегринів $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, і $\alpha 5\beta 1$; бетацеллюліну; апеліну/APJ; еритропоетину; фактора D комплементу; ФНП- α ; HtrA1; рецептора ФРЕС; ST-2-рецептора; і білків, генетично пов'язаних з ризиком ВМД, таких як компоненти шляху комплементу C2, фактор В, фактор Н, CFHR3, C3b, C5, C5a, і C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA;
 60

ІЛ-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CЕТР; LІРС; COL10A1; і TNFRSF10A. У деяких варіантах здійснення додаткова сполука являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент. Наприклад, у деяких випадках додаткова сполука являє собою біспецифічне антитіло (наприклад, анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, таке як RG-7716 або будь-яке анти-ФРЕС/анти-Ang2 біспецифічне антитіло, розкриті у WO 2010/069532 або WO 2016/073157, або його варіант. В іншому прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою анти-ІЛ-6 антитіло, наприклад EBI-031 (Eleven Bioreutics; див., наприклад, WO 2016/073890), силтуксимаб (SYLVANT®), олокізумаб, клазакізумаб, сирукумаб, елсілімомаб, герилізмуаб, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, або його варіант. У ще одному прикладі в деяких випадках додаткова сполука являє собою анти-ІЛ-6R антитіло, наприклад тоцилізумаб (ACTEMRA®) (див., наприклад, WO 1992/019579), сарилумаб, вобарилізумаб (ALX-0061), SA-237, або його варіант.

У деяких випадках пристрій доставки, що імплантується, містить будь-яке з антитіл або кон'югатів антитіл, описаних у цьому документі, і додатковий антагоніст ФРЕС.

III. ПРИКЛАДИ

Нижче наведені приклади способів і композицій згідно з цим винаходом. Зрозуміло, що можуть застосовуватися різні інші варіанти здійснення, враховуючи загальний опис, наведений вище.

Приклад 1: Кон'югати лінійна гіалуронова кислота (ГК) - антитіло, отримані з монодисперсної ГК для поліпшення стабільності

Кон'югування Fab з біополімером гіалуронової кислоти (ГК) може значно поліпшити час утримування Fab в оці, наприклад, шляхом уповільнення дифузії Fab і, таким чином, кліренсу зі склоподібного тіла. Для отримання кон'югату ГК-Fab використовували двостадійний спосіб: спочатку, комерційну ГК модифікували з малеїмідними групами (ГК-малеїмід), а потім, Fab-C (Fab з вільним тіолами на цистеїні), піддавали взаємодії з ГК-малеїмідом з утворенням ковалентних кон'югатів ГК-Fab.

Коли їх виробляють за допомогою типових засобів, кон'югати ГК-білок можуть мати два ортогональних компонента мінливості. Перше джерело мінливості являє собою полідисперсність, яка забезпечувалася полідисперсністю каркаса ГК (Fig. 1A). Друге джерело являє собою гетерогенність, яка забезпечувалася відмінностями в числі молекул Fab, приєднаних до цього ланцюга ГК. Це друге джерело мінливості диктується стохастичною природою малеїмідної модифікації ланцюгів ГК на першій стадії процесу кон'югації ГК. На Fig. 1B представлені результати моделювання методом Монте-Карло, в якому кожній кислотній групі з 200 кДа ланцюга ГК була дана 5 % ймовірність бути підданою взаємодії з лінкером, що містить малеїмід, який повторюється на 1000 незалежних ланцюгах ГК. Отримані результати свідчать про те, що, хоча середнє очікувана кількість малеїмідів на ланцюг ГК у моделюванні становило 24,7, абсолютний діапазон становив від 11 до 42.

Може бути бажано підтримувати фізичну і колоїдну стабільність кон'югатів антитіл (наприклад, кон'югатів антитіл, які містять лінійну ГК і анти-ФРЕС антитіло G6.31 AARR; згадуваних у цьому документі як кон'югати ГК-антитіло G6.31.AARR) у водній фазі і склоподібному тілі. Ґрунтуючись частково на моделюванні, описаних вище, вважається, що молекулярна маса каркаса ГК і рівень завантаження Fab може бути важливими параметрами для фізичної стабільності. Рівень завантаження Fab відноситься до середньої кількості молекул антитіла (наприклад, G6.31.AARR) приєднаної до кожного ланцюга ГК, і виражається у термінах відсотків кислотних груп на каркасі ГК, які ковалентно модифіковані за допомогою фрагмента Fab (кожен повторюваний фрагмент ГК містить одну змінну групу кислот на сахариді глюкуронової кислоти). У той час як інші параметри можуть внести свій вклад у стабільність кон'югації (наприклад, специфічні властивості Fab, зокрема сумарний заряд, розподіл поверхневого заряду, гідрофобність), вони, як правило, неконтрольовані в межах цієї конкретної молекули.

Для того, щоб оцінити вплив MW ГК і рівня завантаження Fab на фізичну стабільність ГК-G6.31.AARR, були отримані кон'югати з трьома різними ГК, починаючи з MW (приблизно 40 кДа, 200 кДа і 600 кДа) і різним рівнем завантаження Fab, випробувані у фізіологічних умовах і контрольовані щодо фізичної стабільності протягом декількох місяців, щоб імітувати біологічний вплив.

(A) Матеріали та методи

(i) Матеріали

У цьому дослідженні використовували гіалуронат натрію (HA, Lifecore Biomedical, Часка, штат Мінесота) з трьома різними молекулярними масами. Їх властивості, оцінені за допомогою ексклюзійної хроматографії з підключеним рефрактометричним детектором і детектором багатокутного лазерного світлорозсіювання (SEC-RI-MALS), узагальнені в Таблиці 4. Мп

позначає середньочисельну молекулярну масу; M_w позначає середньомасову молекулярну масу; PDI позначає індекс полідисперсності; а R_h вказує на гідродинамічний радіус. У Таблиці 5 наведені дані для M_n , M_w , і PDI різних полідисперсних зразків ГК у порівнянні з монодисперсним зразком, визначені за допомогою SEC-RI-MALS. Дані з Таблиць 4 і 5 з двох різних партій HA200K, які мали різні полідисперсності.

Таблиця 4

Властивості ГК, використаної в цьому дослідженні

Назва на етикетці	M_n , кДа	M_w , кДа	PDI	R_h , нм
40K	28,8	45,5	1,581	8,7
200K	143,4	204,3	1,424	23,7
600K	481,6	619,8	1,287	35,6

Таблиця 5

Властивості полідисперсних зразків ГК у порівнянні з монодисперсним зразком

Зразок	M_n (кДа)	M_w (кДа)	PDI (M_w/M_n)
HA10K	13,7	19,6	1,43
HA20K	21,0	32,9	1,57
HA40K	28,7	44,7	1,56
HA100K	66,0	107	1,62
HA200K	116	204	1,76
HA350K	206	314	1,53
HA700K	473	657	1,39
Монодисперсна HA150K	137,2	137,3	1,001

(ii) Синтез малеїмід-функціоналізованих ГК (ГК-мал)

ГК модифікували малеїмідними групами з використанням водної реакції зі зв'язуючим реагентом 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-іл)-4-метилморфолінхлорид (DMTMM) і лінкером N-(2-аміноетил) малеїмідтрифлуороацетатною сіллю (AEM). ГК розчиняли у 100 мМ 2-(N-морфоліно)етансульфонової кислоти (MES) (pH 5,5) за концентрацією 2,5 мг/мл і до цього розчину додавали DMTMM і AEM при перемішуванні. Кількості DMTMM і AEM, що додаються, розрізнялися і були вибрані для різних цільових рівнів функціоналізації малеїмиду у діапазоні від 2 до 10 %. Реакційну суміш нагрівали до 70 °C протягом 2 годин.

Надлишок AET і DMTMM видаляли з реакційної суміші за допомогою процедури знесолення. Знесолювальну колонку HIPREP™ 26/10 монтували на систему очищення ÄKTA™ (GE Life Sciences) і врівноважували 10 мМ ацетату натрію (pH 4,0) 150 мМ NaCl. Реакційну суміш впорскували в чистому вигляді в колонку, а пік ГК-мал збирали відповідно до оптичної густини за 302 нм і концентрували до більш ніж 5 мг/мл з використанням відцентрового пристрою ультрафільтрації. Концентрація малеїмиду у ГК-мал вихідного розчину вимірювали за оптичною густиною при 302 нм за допомогою УФ-видимого спектрофотометра, і молярне відношення груп малеїмиду на ланцюг ГК оцінювали за допомогою ексклюзійної хроматографії з різними кутами розсіювання світла (SEC-MALS).

(iii) Кон'югація Fab-C з ГК-мал

Розчин Fab-C доводили за pH до 6,5 за допомогою 1 М фосфату (pH 6,5) до кінцевої концентрації фосфату, що дорівнює 50 мМ, а етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА), додавали до кінцевої концентрації, рівної 2,5 мМ. Розчин Fab-C перемішували і додавали до нього ГК-мал, розведений в реакційному буфері, що складається з 10 мМ фосфату (pH 6,5), 150 мМ NaCl, і 2,5 мМ ЕДТА. Стехіометрія була встановлена на рівні 1,2 моля Fab-C на моль малеїмиду в кінцевій реакції, а об'єм був встановлений, щоб отримати кінцеву концентрацію білка, яка дорівнює 1 мг/мл. Реакцію кон'югації проводили за кімнатної температури і перемішуванні. Через 3 години додавали меркаптоетанол у відношенні 2 моля на моль малеїмиду для зв'язування непрореагованих груп малеїмиду. Через 30 хвилин реакційну суміш розбавляли 10 мМ фосфату (pH 6,5) до менш ніж 50 мМ NaCl.

Очищення проводили за допомогою ексклюзійної хроматографії (SEC), щоб відокремити вільний Fab-C і димер Fab від кон'югату. Колонку HILoad® 26/600 SUPERDEX® 200 pg (GE Healthcare) врівноважували 10 мМ HisHCl (pH 5,5), 150 мМ NaCl, а реакційну суміш впорскували

в чистому вигляді. Піки, пов'язані з кон'югатом, димером Fab і мономером Fab елюювали окремо, а пік кон'югату збирали.

(iv) Аналіз кон'югатів ГК-Fab за допомогою SEC-RI-MALS

Вміст Fab, вільний від залишків, загальну молярну масу кон'югату і масову частку білка оцінювали за допомогою SEC-RI-MALS-QELS (комбінація ексклюзійної хроматографії (SEC), показника заломлення (RI), багатокутового лазерного світлорозсіювання (MALS) і квазіпружного розсіювання світла (QELS)) на BEPX Agilent 1200 з підключеним рефрактометричним детектором (RI) Wyatt OPTILAB® T-REX™ і детектором багатокутового лазерного світлорозсіювання ((MALS) Wyatt HELEOS™-II. Для SEC послідовно запускали дві колонки: ACCLAIM™ 7,8 × 150 мм розмір пори 1000 Å з подальшою ACCLAIM™ 7,8 × 150 мм розмір пори 300 Å з фосфатним буферним сольовим розчином (PBS) (pH 7,4) як рухливий буфер. Контроль на основі бичачого сироваткового альбуміну (БСА) використовували для нормалізації детекторів MALS і корекції смуги розширення між детекторами. Вміст вільного Fab вимірювали шляхом інтегрування піків УФ A₂₈₀, відповідних Fab і кон'югату ГК-Fab. Молярна маса кон'югату була взята як середньовагова молекулярна маса (Mw) піку кон'югату. Масову частку білка розраховували з використанням білкового аналізу кон'югату з використанням диференціального показника заломлення (dRI) і сигналів УФ A₂₈₀.

(v) Фізіологічний стрес і аналіз кон'югату ГК-G6.31.AARR

Очищені кон'югати розчиняли в буфері PBS з додаванням 2 мМ азиду натрію і 0,01 % полісорбату 20 (PBSTN). Кінцеві концентрації становили приблизно 5 мг/мл на основі Fab. Зразки герметично закривали і інкубували за 37 °С. Ця умова слугує заміником склоподібного тіла (імітуючи pH, температуру та іонні сили склоподібного тіла). Концентрація 5 мг/мл являє собою "стресову" концентрацію для оцінки схильності до осадження у склоподібному віці (доза 2 мг у 4 мл склоподібного тіла людини еквівалентна 0,5 мг/мл Fab). Через певні проміжки часу, зразки відбирали, розбавляли до 1 мг/мл у 10 мМ HisHCl (pH 5,5) з 0,01 % полісорбату 20 і 10 % (мас./об.) трегалози і аналізували на концентрації розчинного білка (A₂₈₀), каламутність (A₄₅₀), час утримання SEC, і молекулярну масу (Mn і Mw за допомогою SEC-RI-MALS як зазначено вище).

(B) Результати

(i) характеристика матеріалів

У Таблиці 6 наведені результати характеристики SEC-RI-MALS для дев'яти кон'югатів, які використовуються в цьому дослідженні. Кон'югати розрізняються як за MW каркаса ГК (40 кДа, 200 кДа або 600 кДа), так і за рівнем завантаження Fab. Назви зразків наведені як MW каркасів ГК(кДа) з подальшим зазначенням рівня завантаження Fab (%).

Таблиця 6

Результати характеристики SEC-RI-MALS вихідних матеріалів ГК-G6.31.AARR

Назва зразка	Mn, кДа	Mw, кДа	Завантаження Fab %
40K 2,8 %	146	178,7	2,78
40K 2,9 %	149,4	182,4	2,85
40K 4,7 %	191,2	272,4	4,65
40K 6,3 %	305,9	354,8	6,31
200K 1,3 %	442,6	518,7	1,28
200K 2,5 %	664,3	813,1	2,45
200K 4,7 %	1106,2	1362,5	4,66
200K 6,2 %	1297,4	1739,3	6,17
600K 2,1 %	1730,6	2141,3	2,06

Полідисперсність кон'югатів ГК-G6.31.AARR експериментально оцінювали з використанням SEC-RI-MALS (Фіг. 1C). Індекс полідисперсності становив 1,58, 1,78 і 1,41 для кон'югатів HA40K, HA200K і HA600K, відповідно.

(ii) Стабільність кон'югату в умовах фізіологічного стресу

В умовах фізіологічного стресу, деякі кон'югати ГК-G6.31.AARR продемонстрували значні фізичні зміни протягом тривалої інкубації у PBSTN. Ця зміна найбільш ясно свідчить про зсув у середній молекулярній масі (Mw - середньовагова молекулярна маса) з плином часу, як це показано на Фіг. 2. У той час як Mw деяких зразків не змінювалися протягом 12-тижневого дослідження, ті, які спостерігали, всі продемонстрували зниження Mw з плином часу. Ступінь зниження Mw залежить як від молекулярної маси каркаса ГК, так і від рівня завантаження Fab.

Загалом, було виявлено, що осадження відбувається в зразках, в яких молекулярна маса ГК і завантаження Fab були вище.

Для того, щоб зрозуміти цей зсув Mw, був виконаний аналіз профілів утримування SEC інкубованих кон'югатів ГК-G6.31.AARR. Час утримування SEC зміщувався на більш пізній час при тривалій інкубації, що свідчить про те, що поступово середня кількість кон'югату ставала меншою з плином часу (Фіг. 3). Оскільки час утримування SEC визначають виключно за молекулярною масою каркаса ГК (а не за завантаженням Fab), це спостереження показало, що або: (а) вся популяція кон'югатів стає меншою з плином часу, або ((b) субпопуляцію з більш високою молекулярною масою осаджували з розчину, що призводило до видимого зміщення до більш дрібних кон'югатів. Ці дані також наведені в Таблиці 7, в якій показана різниця між часом утримування на початку дослідження (T0) і на 12 тижні.

Таблиця 7

Час утримування SEC зразків стабільності ГК-G6.31.AARR на початку дослідження і через 12 тижнів після впливу на фізіологічні умови

Зразок	Час утримування, T0, хв	Час утримування, Тиждень 12, хв	Різниця, хв
40K 2,8 %	13,272	13,267	-0,005
40K 2,9 %	13,364	13,272	-0,092
40K 4,7 %	13,125	13,349	0,224
40K 6,3 %	13,292	13,569	0,277
200K 1,3 %	11,986	11,848	-0,138
200K 2,5 %	12,052	12,787	0,735
200K 4,7 %	12,31	12,448	0,138
200K 6,2 %	11,986	12,502	0,516
600K 2,1 %	10,692	13,627	2,935

Ці зміни, виміряні за допомогою SEC і MALS проводили паралельно з візуальними спостереженнями, що зразки з більш високою молекулярною масою каркаса ГК і більш високим завантаженням Fab містили видимий осад на більш пізніх часових точках. Це спостереження підтримує останнє пояснення спостережуваного зсуву в профілях утримування SEC, тобто, що більш високі субпопуляції молекулярної маси ГК осаджували і призводили до зміщення середньої популяції, що залишилася в розчині.

Далі в підтримку цієї гіпотези проводили повторний аналіз даних SEC-RI-MALS, досліджуючи розподіл кон'югату ГК-G6.31.AARR по відношенню до молекулярної маси, як показано на Фіг. 4. Для зразка каркаса HA40K (ліва панель) загальний розподіл молекул кон'югату по відношенню до молекулярної маси помітно не змінився при тривалому впливі фізіологічних умов. Для зразка каркаса HA600K (праворуч) спостерігали безперервний зсув всіх фракцій популяції до менших молекулярних мас, що вказує на широку популяцію молекул кон'югатів, які осаджувались з розчину. Для зразка каркаса HA200K (центральна панель) зсув у фракціях популяції відбувався головним чином у молекулах кон'югатів з більш високою молекулярною масою. Це вказує на те, що в зразку каркаса HA200K була змішана популяція відносно стабільних і нестабільних молекул кон'югату. Згодом, молекули кон'югату з високою молекулярною масою (відносно нестабільні) осаджують з розчину, залишаючи тільки відносно стабільну субпопуляцію, що залишається в розчині.

(iii) Монодисперсні кон'югати ГК

Грунтуючись на розумінні того, що в полідисперсній популяції HA200K-G6.31.AARR, тільки субпопуляція з більш високою MW є рушійною силою фізичної нестабільності і осадження, ми припустили, що перемикання з полідисперсного каркаса ГК на монодисперсні каркаси ГК може привести до більш стабільного кон'югату антитіла.

Стандартну комерційно доступну ГК отримують шляхом багатостадійного способу, в якому: (а) ГК синтезується за допомогою бактеріальної ферментації, забезпечуючи ГК з надзвичайно високою MW (MW 1-4 МДа), (b) ГК очищають з культури клітин і (c) ГК хімічно розщеплюють контрольованим чином, забезпечуючи випадковий розрив молекул ГК. Ця заключна стадія способу має вирішальне значення для отримання ГК з більш низькою молекулярною масою, що в іншому випадку було б неможливо здійснити лише шляхом ферментації. Проте, випадковий процес деградації розрізання також призводить до широкого (тобто полідисперсного) розподілу молекулярних мас ГК.

ГК також можна синтезувати в промисловому масштабі за допомогою синхронізованого хімічно-ферментативного процесу (див. Jing et al. J. Biol. Chem. 279:42345-42349, 2004; Jing et al. Anal. Biochem. 355:183-188, 2006 і патент США № 8088604, які включені в цей опис шляхом посилання в повному обсязі). У цьому способі, очищений фермент гіалуронансинтази додають до суміші дрібних олігосахаридів ГК (зазвичай тетрамеру ГК, ГК₄) і сахаридів дифосфату уридину (УДФ) УДФ-глюкуронової кислоти і УДФ-N-ацетилглюкозаміну. Фермент гіалуронансинтази збільшує фрагменти олігосахаридів, використовуючи доступний цукор змінним чином, що призводить до синхронної полімеризації ГК. Молекулярна маса отриманого полімеру ГК може бути змінена відношенням субстрату ГК (наприклад, НА₄) до цукру у вихідній реакції. Результатом цього процесу є високо монодисперсні полімери ГК.

Для порівняння, характеристики SEC-RI-MALS полідисперсних і монодисперсних комерційних ГК подібного розміру були зіставлені на Фіг. 5. Найбільш помітною є відмінність в індексі полідисперсності, який становив 1,779 для полідисперсної НА200K і 1,001 для монодисперсної НА150K. Вважається, що цей нижній рівень полідисперсності для монодисперсної ГК забезпечить кілька ключових переваг з точки зору кон'югатів ГК-білок: (а) спрощення аналітичної характеристики, оскільки усунення полідисперсності ГК залишає відмінності в рівнях завантаження білка як єдиного джерела гетерогенності в зразку; (b) усунення низьких і більш високих значень молекулярної маси каркасів ГК в загальній популяції, яка може усунути гетерогенність, і спостережуване осадження за більш високою молекулярною масою каркасів ГК у межах субпопуляції кон'югатів ГК-G6.31.AARR і (c) потенційне зменшення в'язкості сформованого кон'югату ГК-антитіло.

В контексті використання полідисперсних і монодисперсних вихідних матеріалів ГК для приготування кон'югатів G6.31.AARR, спостерігалася та сама різниця в полідисперсності: полідисперсні НА200K-G6.31.AARR мали індекс полідисперсності, рівний 1,228, у той час як монодисперсні НА150K-G6.31.AARR мали індекс полідисперсності, рівний 1,003 (Фіг. 6). Очікується, що ця монодисперсність дозволить поліпшити стабільність кон'югатів ГК-G6.31.AARR через відсутність субпопуляції з більш високою молекулярною масою каркаса ГК, яка, ймовірно, відповідає за нестабільність і осадження, які спостерігаються в умовах фізіологічного стресу для полідисперсних кон'югатів ГК-G6.31.AARR.

Приклад 2: Оптимізоване завантаження Fab і сайти зі сконструйованим цистеїном для кон'югатів антитіло-лінійна ГК

Ковалентне кон'югування моноклональних антитіл (мкАт) або фрагментів антитіл (Fab) з полімерним каркасом може здійснюватися за допомогою широкого спектру хімічних реакцій, починаючи з хімії аміногруп (прямого амідування через залишки лізину, доступних для розчинника) і до хімічно-ферментативних кон'югацій з використанням ферментів, які розпізнають субстрат, таких як трансглутамінази. Останнім часом, хімічна кон'югація тіолу з малеїмідом знайшла значний інтерес, оскільки вона забезпечує кілька ключових переваг у порівнянні з іншими підходами: (а) вона є сайт-селективною, реагує тільки з відновленими, доступними для розчинника залишками цистеїну, (b) вона є надзвичайно швидкою реакцією, (c) лінкери, що містять малеїмід, легко доступні і, як правило, легко доступні синтетично, (d) залишки цистеїну, як правило, можуть бути легко включені у структуру білка, а також (e) кон'югація тіолу з малеїмідом може бути виконана у близькому до нейтрального рН у водних умовах.

Для того, щоб створити Fab, який піддається малеїмідній кон'югації, використовували одну стратегію для отримання Fab-C, в якій послідовність важкого ланцюга продовжували за рахунок шарнірного пептиду з першої або другої позиції дисульфідного цистеїну шарнірної ділянки і усічений на цьому залишку цистеїну (Фіг. 7). На практиці цей підхід потенційно може ввести ряд ускладнень, які впливають на кон'югацію з полімерним каркасом. Первинний наслідок просторової близькості цього вільного залишку цистеїну до міжланцюгового дисульфідного зв'язку є перестановка тіолу, за якою ці три прилеглих залишки цистеїну можуть утворювати три можливі дисульфідні конфігурації. Ці три можливі дисульфідні конфігурації показані графічно на Фіг. 8A-8C. У кожній конфігурації відновлюється різні залишки цистеїну, що робить його потенційним місцем сполучення з каркасом полімеру, що містить малеїмід. Наслідком цього є гетерогенність у місці прикріплення між Fab і каркасом ГК, яка може мати наслідки з точки зору якості продукту, стабільності Fab або безпеки кон'югованого матеріалу.

Ми припустили, що переміщення у вільному цистеїновому залишку від гнучкої, просторово проксимальної послідовності шарніра до подальшого розташування на поверхні Fab може зменшити або усунути ці варіанти кон'югації. Цей підхід аналогічний за своєю природою тому, який використовує моноклональні антитіла TH10MAB™ зі сконструйованим цистеїном, в яких поверхневі залишки замінюють на цистеїни для подальшої кон'югації. У форматі Fab, ми

називаємо Fab, що містять поверхнево-мутований цистеїн, як "thio-Fab".

Білково-полімерні кон'югати, отримані з використанням хімії тіолу з малеїмідом, можуть також піддаватися декон'югації білка з полімерного каркаса за допомогою зворотної реакції приєднання Міхаеля. Це може привести до повільного вивільнення вільного білка з основного ланцюга полімеру pH- і температуро-залежним чином. Така поведінка також залежить від локального хімічного середовища навколо залишку цистеїну і структури лінкера, що містить малеїмід, (наприклад, наявність електроноакцепторних груп або амінів). Грунтуючись на результатах щодо чутливості зворотної реакції Міхаеля до різних місць цистеїну в розробці TH10MAB™ (див. Shen et al. Natl. Biotechnol. 30:184-189, 2012), ми також передбачили, що переміщення вільного цистеїну від шарнірного пептиду до місця на поверхні призведе до зниження швидкості вивільнення вільного Fab з полімерного каркаса у зворотній реакції Міхаеля. Ми також досліджували швидкість декон'югації в зворотній реакції Міхаеля модельного полімеру поліетиленгліколь (ПЕГ) -малеїмід на молекулах формату Fab-C і ThioFab у фізіологічних умовах.

(A) Матеріали та методи

(i) Матеріали

Фермент Lys-C був придбаний у Promega (кат. № V1671, Медісон, штат Вісконсін), фермент гіалуронідаза (рекомбінантний людський PH20, також згадується як HAase) був придбаний у Halozyme (Сан-Дієго, штат Каліфорнія), N-етилмалеїмід (NEM) був придбаний у Sigma Aldrich (Сент-Луїс, штат Міссурі). Певний метоксиполіетиленгліколь малеїмід (d-mPEG4-Mal, партія № 10745) був придбаний у Quanta Biodesign (Плейн Сіті, штат Огайо).

(ii) Обмежене Lys-C розщеплення G6.31.AARR.Fab-C

Обмежене розщеплення за допомогою Lys-C проводили на зразках G6.31.AARR.Fab-C. У порівнянні з більш традиційним Lys-C розщепленням білка, "обмежене" Lys-C розщеплення виконується зі зменшеною кількістю ферменту Lys-C і за неденатуруючих умов. Це призводить до селективного розщеплення частини шарнірного пептиду молекули G6.31.AARR.Fab-C (KTHTC (SEQ ID NO: 61)), який розщеплюється після залишку лізину. За різних умов тестували чотири зразки G6.31.AARR.Fab-C: (a) +NEM, -розщеплення, (b) +NEM +розщеплення, (c) -NEM, +розщеплення, і (d) -NEM, -розщеплення.

Для кожного зразка, до 500 мкг Fab-C в 500 мкл 10 mM гістидин-ацетату +150 mM хлориду натрію додавали 50 мкл 1 M Трис + 10 mM NEM (pH 5,5) (pH 7,5); NEM не додавали для зразків - NEM. Зразки інкубували протягом 30 хв за 37 °C для зв'язування будь-яких вільних тіолів. Фермент Lys-C потім додавали до зразків +Lys-C в масовому співвідношенні 1: 500 Lys-C: FAB-C. Зразки інкубували протягом 30 хв за 37 °C. Після гідролізу зразки були заморожені для зупинки реакції і аналізувалися за допомогою RP-UPLC-TOF.

(iii) Обмежене Lys-C розщеплення HA200K-G6.31 AARR

До 500 мкг (на білковій основі) HA200K-G6.31.AARR у 500 мкл 10 mM гістидину-ацетату +150 mM буфера хлориду натрію (pH 5,5) додавали 50 мкл 1 M Трис (pH 7,5). Фермент Lys-C додавали в масовому співвідношенні 1: 500 Lys-C: FAB-C. Зразки інкубували протягом ночі за 37 °C. Після гідролізу зразки були заморожені для зупинки реакції і аналізувалися за допомогою RP-UPLC-TOF.

(iv) Розщеплення HA200K-G6.31.AARR за допомогою гіалуронідази

500 мкг (на білковій основі) HA200K-G6.31.AARR розводили у 500 мкл 10 mM гістидину-ацетату +150 mM хлориду натрію (pH 5,5). Гіалуронідазу додавали в кількості 10 одиниць (Од) на 1 мкг ГК в кон'югату. Реакційну суміш інкубували за 37 °C протягом 4 год. Після гідролізу зразки були заморожені для зупинки реакції і аналізувалися за допомогою RP-UPLC-TOF.

(v) Декон'югація у зворотній реакції Міхаеля модельних кон'югатів G6.31.AARR-PEG

Для G6.31.AARR.Fab-C, G6.31.AARR.A140C, G6.31.AARR.L174C і G6.31.AARR.K149C замінювали буфер на 10 mM фосфату (pH 6,5), 150 mM NaCl, 2,5 mM ЕДТА в концентрації від 0,2 до 0,5 мг/мл, і додавали d-mPEG4-Mal у 20-кратному молярному надлишку. Реакційну суміш інкубували за кімнатної температури протягом 2 год. з наступним очищенням за допомогою знесолення на колонках PD-10 (GE Healthcare, Піттсбург, штат Пенсільванія) у PBS (pH 7,4). Кон'югати потім концентрували до 1 мг/мл за допомогою відцентрової ультрафільтрації та з добавкою окисненого глутатіону (GSSG) до кінцевої концентрації 2 mM. Конструкти інкубували за 37 °C і періодично відбирали зразки для аналізу за допомогою RP-UPLC-TOF.

(vi) Аналіз методом обернено-фазової недефективної рідинної хроматографії/часопротіної (RP-UPLC-TOF) мас-спектрометрії (MS)

Інтактні маси зразків були отримані за допомогою аналізу методом рідинної хроматографії і тандемної мас-спектрометрії (PХ/МС) з використанням часопротіного (TOF) мас-спектрометра з іонізацією електророзпиленням (ESI) Agilent 6230 з системою недефективної рідинної

хроматографії (UPLC) Agilent 1290. Приблизно 2,5 мкг білка вводили на зразок і знесолювали за допомогою обернено-фазової недефективної рідинної хроматографії (RP-UPLC) для прямого онлайн МС-аналізу. Отримані спектри піддавали деконволюції до стану нульового заряду, використовуючи робочу станцію з програмним забезпеченням для якісного аналізу MassHunter Workstation/Qualitative Analysis (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, Каліфорнія).

(В) Результати

(i) Дисульфідний статус в G6.31.AARR.Fab-C

Для підтвердження наявності трьох дисульфідних станів, наведених на Фіг. 8А-8С, які існують в G6.31.AARR.Fab-C, і зберігаються в динамічній термодинамічній рівновазі, ми провели серію експериментів з використанням малеїмідного кепування з використанням NEM і обмежених Lys-C розщеплень, щоб дослідити як миттєвий статус трьох цистеїнових залишків, так і їх здатність динамічно перегруповуватися.

У першому експерименті, G6.31.AARR.Fab-C піддавали кепуванню з використанням NEM (фіксує дисульфідний статус за рахунок усунення будь-яких вільних тіолів), а потім піддавали обмеженому Lys-C розщепленню, розщеплюючи послідовність шарнірного пептиду важкого ланцюга до передбачуваного вільного залишку цистеїну (Фіг. 9, друга хроматограма). Після денатуруючого аналізу на RP-UPLC-TOF спостерігали види, пов'язані з трьома дисульфідними станами, представленими на Фіг. 8А-8С: (а) неушкоджений Fab-мінус шарнірний пептид (що має відношення до Фіг. 8А); (b) легкий ланцюг плюс NEM і циклізований важкий ланцюг (що має відношення до Фіг. 8В); і (с) легкий ланцюг плюс шарнірний пептид і важкий ланцюг мінус шарнірний пептид плюс NEM (що має відношення до Фіг. 8С). Цей експеримент продемонстрував, що G6.31.AARR.Fab-C не існує в однорідному стані, но містить три різних види з різними дисульфідними конфігураціями і, отже, реакційноздатними залишками цистеїну.

У другому експерименті, G6.31.AARR.Fab-C піддавали обмеженому Lys-C розщепленню без NEM кепування, залишаючи цистеїнам можливість динамічно перегруповуватися (Фіг. 9, третя хроматограма). У цьому експерименті, майже всі білки, що проаналізовані за допомогою RP-UPLC-TOF, були в одному і тому самому стані: Fab мінус шарнірний пептид. Беручи до уваги результати першого експерименту, цей другий набір даних вказує на те, що три вільні цистеїни динамічно перегрупувалися і у відносно прискореному масштабі часу (30 хв тривалість експерименту). Після розщеплення шарнірного пептиду за допомогою Lys-C, три можливих дисульфідних стани динамічно "скремблюються" між трьома залишками цистеїну. Якщо в якийсь момент часу утворюється правильний міжланцюговий дисульфід, послідовність шарнірного пептиду залишають для вивільнення в розчин, оскільки вона була попередньо розщеплена за допомогою Lys-C. У результаті цього процесу перегруповування зразок рухається до повністю правильно сформованого міжланцюгового дисульфиду.

Ці два експерименти підтвердили, що G6.31.AARR.Fab-C може існувати в трьох різних станах відносно трьох проксимальних залишків цистеїну, і що їх відносний вміст визначається динамічною термодинамічною рівновагою. Ця остання обставина має важливе значення, оскільки вона вказує на те, що жодна стадія додаткової обробки не може повністю усунути дві неправильні дисульфідні конфігурації, так як з урахуванням будь-якого короткого періоду часу три цистеїни повторно скремблюються, щоб утворити три варіанти, які спостерігаються в першому експерименті.

(ii) Варіанти кон'югації в кон'югатах HA-G6.31.AARR.Fab-C

У той час як ці три дисульфідні варіанти присутні в G6.31.AARR.Fab-C, залишилося продемонструвати, що вони також існують як варіанти в кон'югатах HA-G6.31.AARR. Для того, щоб з'ясувати точне місце розташування кон'югації окремих молекул G6.31.AARR.Fab-C з ГК-малеїмідом, ми використовували дві процедури ферментативного розщеплення. Перше, обмеженим Lys-C розщепленням G6.31.AARR розщеплюється при шарнірному пептиді, що передує передбачуваному вільному залишку цистеїну важкого ланцюга. У правильно кон'югованих молекулах G6.31.AARR, ця обробка має звільнити вільний інтактний G6.31.AARR у розчин. Однак аналіз розщеплених зразків за допомогою RP-UPLC-TOF у денатуруючих умовах визначив додаткові види в розчині: вільний легкий ланцюг плюс розщеплений шарнірний пептид (Фіг. 10А). Присутність цього виду підтверджує, що популяцію G6.31.AARR.Fab-C кон'югували з ГК через цистеїн важкого ланцюга, зазвичай зайнятий міжланцюговим дисульфідом, імовірно, який походить з дисульфідного варіанту, зображеного на Фіг. 8С.

Друга процедура ферментативного розщеплення зберігала всі сполучення недоторканими, але повністю розщепила каркас ГК за допомогою гіалуронідази (HAase). Це дозволило не тільки аналізувати вільні молекули в розчині, а й кон'юговані білки з ковалентно зв'язаними малими олігосахаридами ГК. Цей метод дозволяв безпосередньо спостерігати кон'юговані види на індивідуальному рівні. У цьому експерименті спостерігали молекули G6.31.AARR, що були

правильно кон'юговані з ГК через передбачуваний кінцевий цистеїн важкого ланцюга; однак, були також знайдені прямі докази кон'югації через дисульфідний варіант, зображений на Фіг. 8В. Це припущення було підтверджено двома спостереженнями: (а) наявністю вільних молекул циклізованого важкого ланцюга в розчині; і (b) наявністю олігосахаридів ГК з ковалентно приєднаним maleimide лінкером плюс легким ланцюгом (Фіг. 10В). Присутність цих видів підтверджує, що популяцію G6.31.AARR.Fab-C кон'югували з ГК через цистеїн легкого ланцюга, зазвичай зайнятий міжланцюговим дисульфідом, імовірно, який походить з дисульфідного варіанту, зображеного на Фіг. 8В.

Ці два експерименти з розщепленням підтвердили, що дисульфідне перегрупування дійсно призводить до змін в місці приєднання G6.31.AARR.Fab-C і ГК-maleimide. Це спостереження, як очікується, може бути застосовано до будь-якого каркасу полімеру, що містить maleimide, використовуваного для кон'югації, і будь-якого Fab-C, що містить цю конфігурацію з трьох залишків цистеїну безпосередньо поруч.

(iii) Конструювання Fab, що містить вільний цистеїн, для більш однорідної кон'югації

Дані, описані вище, демонструють, що три варіанти кон'югації існують при приєднанні молекули Fab-C до каркасу полімеру, що містить maleimide. Ця неоднорідність кон'югації обумовлена наявністю трьох різних дисульфідних конфігурацій в термодинамічній рівновазі, причому кожна конфігурація залишає доступний для кон'югації залишок цистеїну, що відрізняється від інших. Те, що ці три дисульфідні конфігурації можливі, швидше за все, залежить від кількох факторів, зокрема близькості передбачуваного вільного цистеїнового залишку шарніра до міжланцюгового дисульфіду і гнучкості послідовності шарнірного пептиду, до якого приєднаний вільний цистеїн.

Для того, щоб уникнути скремблювання (scrambling) вільного цистеїну з міжланцюговим дисульфідом, ми передбачили переміщення вільного цистеїну далі від міжланцюгового дисульфіду. Таким чином, ми урізали шарнірну послідовність, як це типово для стандартної молекули Fab-формату і замінили залишки поверхні Fab на залишки цистеїну. Ці сайти були вибрані таким чином, щоб вони були досить далеко від HVR так, щоб не чинити негативний вплив на зв'язування антигена, і щоб були досить далеко від міжланцюгового дисульфіду, щоб запобігти скремблюванню.

Для початкового скринінгового дослідження на основі попередніх звітів від розробки TH10MAB™ було вибрано три сайти, що відповідають цим критеріям: LC-K149 (нумерація EU), HC-A140 (нумерація EU) і HC-L174 (нумерація EU). Кожен сайт був замінений на залишок цистеїну і шарнірний пептид був закінчений безпосередньо перед першим дисульфідним цистеїном шарнірної ділянки (тобто KTHT; SEQ ID NO: 87).

Для того, щоб підтвердити, що ці цистеїнові сайти все ще реакційноздатні по відношенню до ГК-maleimide, ми провели пілотні сполучення зв'язків у стандартних умовах (10 mM фосфату (pH 6,5), 150 mM NaCl і 2,5 mM EDTA) і оцінювали продукти за даними SEC-RI-MALS після того, як інкубували протягом ночі. Сполучення протікало нормально з генерацією кон'югатів HA-G6.31.AARR за правильного часу утримування в порівнянні з контролем реакції кон'югації G6.31.AARR.Fab-C (Фіг. 11). Єдина істотна відмінність, відзначена для зразків тіо-Fab, полягала в більш низькому ступені перетворення Fab у кон'югат. Це, ймовірно, викликано порівняно низьким pH реакції кон'югації (pH 6,5), який може бути краще придатний для pKa цистеїну шарніра в порівнянні з таким сконструйованих залишків цистеїну тіо-Fab. Очікується, що збільшення pH реакції кон'югації підвищить вихід сполучень тіо-Fab.

(iv) Чутливість зворотної реакції приєднання Міхаеля форматів Fab-C і тіо-Fab

G6.31.AARR у форматах Fab-C і тіо-Fab кон'югували з модельними конструктами ПЕГ-maleimide і інкубували у PBS за 37 °C з GSSG, щоб діяти як пастка для вільних тіолів (тобто, запобігання зворотної реакції приєднання Міхаеля вільного тіолу, що виділився, з ПЕГ-maleimide), а потім періодичний аналіз за допомогою RP-UPLC-TOF. У конструктах Fab-C-ПЕГ спостерігали значну декон'югацію у зворотній реакції Міхаеля протягом перших семи діб, що призводило до втрати 9,8 % інтактного кон'югату (Фіг. 12). Кон'югати тіо-Fab продемонстрували різні рівні поліпшення у порівнянні Fab-C з варіантом A140C, що демонструє майже повну відсутність декон'югації до 14 діб, варіант L174C, що демонструє 5,9 % декон'югації, і варіант K149C, що демонструє 7,1 % декон'югації за той самий час. Ці дані вказують на те, що варіанти цистеїнової мутації можуть бути захисними проти декон'югації білка, опосередкованої зворотною реакцією Міхаеля, і можуть забезпечити значну перевагу в порівнянні з форматом Fab-C у збереженні інтактних кон'югатів білок-полімер.

Приклад 3: Ілюстративні анти-ФРЕС антитіла для застосування в кон'югатах антитіл за винаходом

Будь-яке з анти-ФРЕС антитіл, описаних у цьому документі, може бути використано для

- отримання кон'югатів антитіл, як описано в Прикладах 1 і 2. Наприклад, будь-яке анти-ФРЕС антитіло, описане в міжнародній патентній заявці № PCT/US2016/053454, може бути використано. У Таблиці 8 описані ілюстративні анти-ФРЕС антитіла, які можуть бути використані, а також амінокислотні послідовності з доменів VH і VL для кожного антитіла. У Таблиці 9 описані амінокислотні послідовності HVR VL для анти-ФРЕС антитіл, описаних у Таблиці 8. У Таблиці 10 описані амінокислотні послідовності HVR VH для анти-ФРЕС антитіл, описаних у Таблиці 8. У конкретних варіантах здійснення використовується анти-ФРЕС антитіло G6.31 AARR (також зване в цьому документі як "G6.31.AARR").

Таблиця 8

Амінокислотні послідовності VH і VL для ілюстративних анти-ФРЕС антитіл

Назва антитіла	Варіант VH (SEQ ID NO:)	Варіант VL (SEQ ID NO:)
G6.31 ДТ	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 42)	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 38)
LC-N94A	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 42)	N94A (SEQ ID NO: 41)
LC-N94A.LC-F83A	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 42)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	A40E.T57E (SEQ ID NO: 40)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	N82aR.Y58R (SEQ ID NO:11)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
HCcombo	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 38)
HCLC2	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo2 (SEQ ID NO: 35)
HCLC4	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo4 (SEQ ID NO: 37)
HCLC5	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
HCLC3	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo3 (SEQ ID NO: 36)
HCLC1	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo1 (SEQ ID NO: 34)
R19HCcombo	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	G6.31 ДТ (SEQ ID NO: 38)
R19HCLC2	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	LCcombo2 (SEQ ID NO: 35)
R19HCLC4	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	LCcombo4 (SEQ ID NO: 37)
R19HCLC5	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)

Таблиця 9

Послідовності HVR VL для антитіл з Таблиці 8

Назва антитіла	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
G6.31 ДТ	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
LC-N94A	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
LC-N94A.LC-F83A	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCcombo	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
HCLC2	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC4	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC5	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC3	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC1	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
R19HCcombo	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
R19HCLC2	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
R19HCLC4	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
R19HCLC5	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO: 9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)

Послідовності HVR VH для антитіл з Таблиці 8

Назва антитіла	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3
G6.31 ДТ	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYTTYADSVKG (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
LC-N94A	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYTTYADSVKG (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
LC-N94A.LC-F83A	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYTTYADSVKG (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 21)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 7)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
HCcombo	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
HCLC2	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
HCLC4	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
HCLC5	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
HCLC3	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
HCLC1	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
R19HCcombo	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
R19HCLC2	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
R19HCLC4	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)
R19HCLC5	DYWIH (SEQ ID NO: 1)	GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3)

Верхня шарнірна ділянка важкого ланцюга Fab будь-яких з антитіл, перерахованих вище, наприклад, G6.31 AARR, може бути мutowана для видалення реактивності до аутоантитіл проти шарніра IgG1, про яку повідомлялося в літературі. Див., наприклад, Brezski et al., J. Immunol. 181:3183-3192, 2008 і Brezski et al., mAbs 2:3, 212-220, 2010. Таким чином, С-кінцева амінокислота важкого ланцюга G6.31 AARR може бути або Т (версія дикого типу (ДТ)) або L (варіант версії, який позбавлений реактивності до Fab проти IgG людини). Повнорозмірна амінокислотна послідовність важкого ланцюга G6.31 AARR дикого типу являє собою SEQ ID NO: 48. Повнорозмірна амінокислотна послідовність важкого ланцюга варіанту версії, який позбавлений реактивності до Fab проти IgG людини, являє собою SEQ ID NO: 49. Повнорозмірна амінокислотна послідовність легкого ланцюга як для G6.31 AARR, так і варіанта версії, який позбавлений реактивності до Fab проти IgG людини, являє собою SEQ ID NO: 50.

Амінокислотні послідовності легкого ланцюга і важкого ланцюга варіанта антитіла, сконструйованого введенням цистеїну, G6.31.AARR.LC-K149C наведені нижче (LC-C149 виділена напівжирним шрифтом і підкреслена).

Легкий ланцюг (LC):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS
GSGTDFLTITSLQPEDAATYYCQGGYGGAPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
CLLNNFYPRKAKVQWCVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89).

Важкий ланцюг (HC):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTRYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMRLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL

APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 90).

Амінокислотні послідовності легкого ланцюга і важкого ланцюга варіанта антитіла, сконструйованого введенням цистеїну, G6.31AARR.HC-A140C наведені нижче (HC-C140 виділена жирним шрифтом і підкресленням).

LC:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS
GSGTDFLTISLQPEDAATYYCQQGYGAPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 91).

HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTRYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMRLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 92).

Амінокислотні послідовності легкого ланцюга і важкого ланцюга варіанта антитіла, сконструйованого введенням цистеїну, G6.31AARR.HC-L174C наведені нижче (HC-C174 виділена жирним шрифтом і підкресленням).

LC:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS
GSGTDFLTISLQPEDAATYYCQQGYGAPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93).

HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTRYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMRLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVCQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 94).

Приклад 4: Кон'югати HA-G6.31.AARR, отримані з монодисперсної ГК, демонструють поліпшену фізичну стабільність в умовах фізіологічного стресу в порівнянні з кон'югатами HA-G6.31.AARR, отриманими з полідисперсної ГК

(A) Матеріали та методи

Монодисперсні ГК синтезували за допомогою хімічно-ферментативного процесу з використанням гіалуронансинтази *Pasteurella multocida* (PmHAS), отриманої від Hyalose (Оклахома-Сіті, штат Оклахома). Всі інші хімічні речовини і реагенти були від Sigma Aldrich (Сент-Луїс, штат Міссурі).

Монодисперсні ГК (моноГК, Mw 137 кДа, R_n 21,2 нм), модифікували з N-(2-аміноетил)малеїдом, як описано вище, щоб вона містила 4,0 % maleimide груп. G6.31.AARR.Fab-C потім кон'югують з каркасом моноГК-малеїмід, як описано вище, і очищали за допомогою SEC на колонці HILOAD® SUPERDEX® 200 pg з PBS, за pH 7,4 рухомого буфера. Кон'юговані фракції об'єднували і підтверджували за допомогою SEC-RI-MALS.

Очищений моноГК-G6.31.AARR концентрували за допомогою ультрафільтрації до 5 мг/мл (на основі Fab) у PBS, з додаванням азиду натрію і полісорбату 20 (PS20) до кінцевої концентрації 2 мМ і 0,01 %, відповідно, і інкубували за 37 °C. У певні моменти часу відбирали зразки і розбавляли до 1 мг/мл у буфері, що містить 10 мМ His-HCl (pH 5,5), 150 мМ NaCl, 10 % (вага/об'єм) трегалози і 0,01 % полісорбату 20, а потім аналізували на концентрацію розчинного білка (A₂₈₀), каламутність (A₄₅₀), час утримання SEC і молекулярну масу (Mn і Mw за даними SEC-RI-MALS).

(B) Результати

Кон'югати ГК-G6.31.AARR, отримані з використанням монодисперсної ГК продемонстрували значно поліпшену фізичну стабільність до чотирьох тижнів у порівнянні з кон'югатом ГК-G6.31.AARR, отриманим з полідисперсної ГК подібного розміру за тим самим рівнем завантаження Fab (Fig. 14). Молекулярна маса (Mw) моноГК-G6.31.AARR незначно знизилася з 0 тижня до 2 тижня і 4 тижня, але ця втрата могла бути повністю пояснена втратою вільного Fab внаслідок декон'югації у зворотній реакції Міхаеля, як це зазвичай спостерігається для білків, кон'югованих з maleimide через тиол. Також не було помітного зсуву в часі утримування SEC для моноГК-G6.31.AARR, що вказувало на те, що фізичний розмір кон'югату не змінився з плином часу.

Ці результати ясно підтверджують гіпотезу про те, що в популяції кон'югатів ГК-G6.31.AARR, отриманих з вихідної речовини полідисперсних ГК, субпопуляція на основі ГК з високою

молекулярною масою відповідає за фізичну нестабільність, яка спостерігається після фізіологічного стресу. Видалення цієї субпопуляція шляхом гомогенізації вихідної речовини ГК (тобто, виходячи з монодисперсної ГК) призводить до більш стабільної молекули кон'югату, яка є менш схильною до осадження в умовах фізіологічного стресу. Ці дані додатково підтримують використання кон'югатів ГК-G6.31.AARR, отриманих з речовини монодисперсної ГК, як терапевтичних агентів для застосування *in vivo*.

Хоча вищевикладений винахід з метою однозначності розуміння був описаний з деякими подробицями для ілюстрації і прикладів, опис і приклади не слід сприймати як обмежуючі обсяг винаходу. Зміст всіх патентів і наукової літератури, що згадуються в цьому документі, в явній формі і в повному обсязі включено шляхом посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Genentech, Inc.
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> ОПТИМІЗОВАНІ КОМПОЗИЦІЇ АНТИТІЛ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ОЧЕЙ

<130> 50474-160WO3

<150> US 62/475163

<151> 2017-03-22

<160> 94

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 1

Asp Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Хаа являє собою Ile або His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Хаа являє собою Ala або Arg

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа являє собою Tyr або Lys
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа являє собою Thr або Glu
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Хаа являє собою Arg, Tyr, Gln, або Glu
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Хаа являє собою Ala або Glu
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Хаа являє собою Lys або Glu
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Хаа являє собою Gly або Glu
 30
 <400> 2

 Gly Xaa Thr Pro Xaa Gly Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Asp Ser Val Xaa
 1 5 10 15
 35
 Хаа

 40
 <210> 3
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 45
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 <400> 3
 50
 Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 55
 <210> 4
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 60
 <220>

- <223> Синтетичний конструкт
- <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа являє собою Asp або Arg
- <400> 4
 10 Arg Ala Ser Gln Xaa Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10
- 15 <210> 5
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
- 20 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
- <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа являє собою Ser або Met
- <400> 5
 30 Xaa Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5
- 35 <210> 6
 <211> 9
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
- 40 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
- <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа являє собою Gln, Asn, або Thr
- <220>
 50 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа являє собою Ala, Asn, Gln, або Arg
- <400> 6
 55 Xaa Gln Gly Tyr Gly Xaa Pro Phe Thr
 1 5
- 60 <210> 7

<211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 7
 10 Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 15
 <210> 8
 <211> 11
 20 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 25 <400> 8
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 30
 <210> 9
 <211> 7
 35 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 40 <400> 9
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5
 45
 <210> 10
 <211> 9
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 10
 55 Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe Thr
 1 5
 60 <210> 11

<211> 120
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 11

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

15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

35 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12
 <211> 107
 <212> Білок
 45 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

50 <400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

60

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

5 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

10 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

15 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

20
<210> 13
<211> 30
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

25
<220>
<223> Синтетичний конструкт

30
<400> 13

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

35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser
20 25 30

40
<210> 14
<211> 14
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

45
<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 14

50 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

55
<210> 15
<211> 32
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

60
<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 15

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

5

Met Arg Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

10

<210> 16
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

15

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 16

20

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

25

<210> 17
 <211> 23
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

30

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 17

35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

40

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

45

<210> 18
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

50

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 18

55

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

60

<210> 19
 <211> 32
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт
 5 <400> 19
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 10 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 15 <210> 20
 <211> 10
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 20 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 20
 25 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10
 <210> 21
 30 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 35 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 21
 Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 40 1 5 10 15
 Gly
 45
 <210> 22
 <211> 17
 <212> Білок
 50 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 55 <400> 22
 Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15
 60

Gly

- 5 <210> 23
 <211> 9
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
- 10 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 23
- 15 Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe Thr
 1 5
- 20 <210> 24
 <211> 32
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
- 25 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 24
- 30 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
- 35 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
- 40 <210> 25
 <211> 23
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
- <220>
 <223> Синтетичний конструкт
- 45 <400> 25
- Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
- 50 Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys
 20
- 55 <210> 26
 <211> 23
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
- 60 <220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 26

5 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

10 Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 27
<211> 15
15 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт
20
<400> 27

25 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 28
<211> 32
30 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

35 <400> 28

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

40 Leu Thr Ile Glu Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

45 <210> 29
<211> 30
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

50 <220>
<223> Синтетичний конструкт
<400> 29

55 Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

60 Ser Leu Glu Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser
20 25 30

5 <210> 30
 <211> 14
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 10 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 <400> 30
 Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10
 15

 20 <210> 31
 <211> 32
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 25 <400> 31
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 30
 Met Asn Glu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

 35 <210> 32
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 40 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 <400> 32

 45 Trp Gly Gln Gly Glu Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 50 <210> 33
 <211> 120
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 55 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 <400> 33

 60 Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Glu Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 5
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 10
 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 15
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 20
 Leu Gln Met Asn Glu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25
 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 30
 Gly Glu Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 34
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 34
 40
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 45
 Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 50
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 55
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
85 90 95

5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10 <210> 35
<211> 107
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

15 <220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 35

20 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

30 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

35 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Glu Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

40 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
85 90 95

45 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

50 <210> 36
<211> 107
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

55 <400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

60

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

5 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

10 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
85 90 95

20 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

25 <210> 37
<211> 107
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

30 <220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 37

35 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

40 Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

45 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

50 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

55 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
85 90 95

60 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 38
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 10 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 <400> 38

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

 20 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 25 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 30 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe
 85 90 95

 35 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

 40 <210> 39
 <211> 14
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 45 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 <400> 39

 50 Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

 55 <210> 40
 <211> 120
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 60 <220>

<223> Синтетичний конструктор

<400> 40

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

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

30 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

35 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41

<211> 107

<212> Білок

40 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструктор

45 <400> 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

50 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

55 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

60 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

5 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
 85 90 95
 10 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 15 <210> 42
 <211> 120
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 20 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 42
 25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 35 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 40 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 45 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 50 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 55 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 43
 <211> 227
 <212> Білок
 60 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструктор

5 <400> 43

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

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

15

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

20

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

25

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

30

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

Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

35

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

40

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

45

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

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

50

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

55

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

60

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

5 Lys Thr His
 225
 <210> 44
 <211> 32
 <212> Білок
 10 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 15 <400> 44
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 20 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 25 <210> 45
 <211> 23
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 30 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 45
 35 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 40 Asp Arg Val Thr Ile Asp Cys
 20
 <210> 46
 <211> 107
 45 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 50 <400> 46
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 55 Asp Arg Val Thr Ile Asp Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 60

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

5 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

10 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

15 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

20 <210> 47
<211> 232
<212> Білок
<213> Homo sapiens

25 <400> 47

30 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

35 Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

40 Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

45 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

50 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

55 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

60

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
130 135 140

5 Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
145 150 155 160

10 Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp
165 170 175

15 Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
180 185 190

20 His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn
195 200 205

Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr
210 215 220

25 Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
225 230

30 <210> 48
<211> 228
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

35 <220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 48

40 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

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

50 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

55 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
5

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
10

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
15

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
20

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
25

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
30

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
35

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
40

Lys Thr His Thr
225
45

<210> 49
<211> 228
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
45

<220>
<223> Синтетичний конструкт
45

<400> 49
50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
55

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30
60

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

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

15 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

20 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

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

35 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

40 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

45 Lys Thr His Leu
225

<210> 50
50 <211> 214
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
55 <223> Синтетичний конструкт

<400> 50

60 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 5
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 10
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 15
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 20
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 25
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 30
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 35
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 40
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 45
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 50
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 55
 <210> 51
 <211> 120
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 60
 <220>

<223> Синтетичний конструктор

<400> 51

5 Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

20 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

25 Leu Gln Met Asn Glu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

30 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

35 Gly Glu Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52

<211> 30

<212> Білок

40 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструктор

45 <400> 52

Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser
20 25 30

55 <210> 53

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

60 <220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 53

5 Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

10 Gly

<210> 54
<211> 32
15 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт
20

<400> 54

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

25

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

30

<210> 55
<211> 10
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

35

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 55

40

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
1 5 10

45 <210> 56
<211> 34
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

50 <220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 56
catcagatgg cgggaagatg aagacagatg gtgc 34

55

<210> 57
<211> 23
<212> ДНК
60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт
 5 <400> 57
 gccatccaga tgaccagtc tcc 23
 <210> 58
 10 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 15 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 58
 ggctgcacca tctgtcttc 19
 20
 <210> 59
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 25
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 59
 30
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 35 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 40 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 45
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 50
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe
 85 90 95
 55 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 60 <210> 60
 <211> 107

<212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 5 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 60
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 10 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 15 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 20 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
 30 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 35
 <210> 61
 <211> 5
 <212> Білок
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 61
 Lys Thr His Thr Cys
 1 5
 50
 <210> 62
 <211> 5
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 55
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 62
 60

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

5 <210> 63
<211> 17
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 63

15 Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

20 Gly

25 <210> 64
<211> 20
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт
30
<400> 64

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
1 5 10 15

35

Ala Phe Asp Ile
20

40 <210> 65
<211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

45 <220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 65

50 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1 5 10

55 <210> 66
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

60 <220>

<223> Синтетичний конструктор

<400> 66

5 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 67
10 <211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
15 <223> Синтетичний конструктор

<400> 67

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val
20 1 5 10

<210> 68
<211> 129
25 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
30 <223> Синтетичний конструктор

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
35 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

60

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

5 Ser

10 <210> 69
<211> 110
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

15 <220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 69

20 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30
25

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

30 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

35 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

40 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110
45

50 <210> 70
<211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

55 <400> 70

Gly Thr Lys Val Glu Cys Lys Arg Thr Val Ala
1 5 10

60

5 <210> 71
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 71
 10 Lys Val Glu Ile Lys Cys Thr Val Ala Ala Pro
 1 5 10
 15 <210> 72
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 72
 25 Asn Asn Phe Tyr Pro Cys Glu Ala Lys Val Gln
 1 5 10
 30 <210> 73
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 73
 40 Ala Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu
 1 5 10
 45 <210> 74
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 74
 50 Gln Gly Thr Leu Val Cys Val Ser Ser Ala Ser
 1 5 10
 55 <210> 75
 <211> 11
 <212> Білок
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт
 5 <400> 75
 Thr Ser Gly Gly Thr Cys Ala Leu Gly Cys Leu
 1 5 10
 10
 <210> 76
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 15
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 76
 20
 Thr Phe Pro Ala Val Cys Gln Ser Ser Gly Leu
 1 5 10
 25
 <210> 77
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 30
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 77
 35 Leu Gln Ser Ser Gly Cys Tyr Ser Leu Ser Ser
 1 5 10
 40
 <210> 78
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 45 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 78
 Leu Ser Ser Val Val Cys Val Pro Ser Ser Ser
 50 1 5 10
 <210> 79
 <211> 11
 55 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 60

<400> 79
 His Lys Pro Ser Asn Cys Lys Val Asp Lys Lys
 1 5 10
 5
 <210> 80
 <211> 11
 <212> Білок
 10 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 15 <400> 80
 Pro Glu Val Thr Cys Cys Val Val Asp Val Ser
 1 5 10
 20
 <210> 81
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 25
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 81
 30 Thr Cys Leu Val Lys Cys Phe Tyr Pro Ser Asp
 1 5 10
 35 <210> 82
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 40 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 82
 45 Leu Val Lys Gly Phe Cys Pro Ser Asp Ile Ala
 1 5 10
 50 <210> 83
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 55 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 83
 60 Ile Ala Val Glu Trp Cys Ser Asn Gly Gln Pro
 1 5 10

5 <210> 84
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 10 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 <400> 84

 Gln Gly Asn Val Phe Cys Cys Ser Val Met His
 1 5 10
 15

 20 <210> 85
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 25 <400> 85

 His Glu Ala Leu His Cys His Tyr Thr Gln Lys
 1 5 10
 30
 <210> 86
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 <400> 86
 40
 His Asn His Tyr Thr Cys Lys Ser Leu Ser Leu
 1 5 10

 45 <210> 87
 <211> 4
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 50 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 <400> 87

 55 Lys Thr His Thr
 1

 60 <210> 88
 <211> 8

<212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> Синтетичний конструкт

 <400> 88

 Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys
 10 1 5

 <210> 89
 <211> 214
 15 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 20
 <400> 89

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 25 1 5 10 15

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 30 20 25 30

 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 35 40 45

 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 35 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 40 65 70 75 80

 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
 45 85 90 95

 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

 50 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

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

 Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 60 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 5
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 10
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 15 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 90
 20 <211> 228
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 90
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 30
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 35
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 40
 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 45 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 50
 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 55
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 60

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

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

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

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

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

25 Lys Thr His Thr
 225

30 <210> 91
 <211> 214
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

35 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 91

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

45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

50 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

55 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

60 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 5
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 10
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 15
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 20
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 25
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 30
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 35
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 40
 <210> 92
 <211> 228
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 45
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 92
 50
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 55
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 60
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

10 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

15 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Cys Ala
 130 135 140

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

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

30 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

35 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

40 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr
 225

45 <210> 93
 <211> 214
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 93

55 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

60 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 5
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 10
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 15
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
 85 90 95
 20
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 25
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 30
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 35
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 40
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 45
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 50
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 55
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 60
 <210> 94
 <211> 228
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 94

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

 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

 15 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

 25 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 30 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

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

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

 45 Cys Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

 50 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

 55 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

 Lys Thr His Thr
 225

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Кон'югат антитіла, що містить: (i) антитіло, і (ii) полімер гіалуронової кислоти (ГК), ковалентно приєднаний до антитіла, причому полімер ГК має індекс полідисперсності (PDI - polydispersity index) 1,1 або нижче та молекулярну масу близько 1 мегадальтона (MDa) або нижче, де антитіло специфічно зв'язується з ФРЕС і включає наступні шість гіперваріабельних ділянок (HVRs):
 - (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність DYWIH (SEQ ID NO: 1);
 - (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7);
 - (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3);
 - (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8);
 - (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO: 9); та
 - (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10).
2. Кон'югат антитіла за п. 1, який **відрізняється** тим, що полімер ГК має PDI від 1,0 до 1,1.
3. Кон'югат антитіла за п. 2, який **відрізняється** тим, що полімер ГК має PDI від 1,0 до близько 1,07.
4. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що полімер ГК має PDI від близько 1,0001 до близько 1,06.
5. Кон'югат антитіла за п. 4, який **відрізняється** тим, що полімер ГК має PDI близько 1,05.
6. Кон'югат антитіла за пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що полімер ГК має молекулярну масу від близько 25 до близько 500 кДа.
7. Кон'югат антитіла за п. 6, який **відрізняється** тим, що полімер ГК має молекулярну масу від близько 100 до близько 250 кДа.
8. Кон'югат антитіла за п. 7, який **відрізняється** тим, що полімер ГК має молекулярну масу від близько 150 до близько 200 кДа.
9. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що полімер ГК являє собою лінійний полімер ГК.
10. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що антитіло додатково містить наступні каркасні ділянки (FR) варіабельного домену важкого ланцюга (VH):
 - (a) FR-H1, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13);
 - (b) FR-H2, що містить амінокислотну послідовність WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14);
 - (c) FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); і
 - (d) FR-H4, що містить амінокислотну послідовність WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16).
11. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що антитіло додатково містить наступні FR варіабельного домену легкого ланцюга (VL):
 - (a) FR-L1, що містить амінокислотну послідовність WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 17);
 - (b) FR-L2, що містить амінокислотну послідовність WYQQKPKGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18);
 - (c) FR-L3, що містить амінокислотну послідовність GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); і
 - (d) FR-L4, що містить амінокислотну послідовність FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).
12. Кон'югат антитіла за п. 11, який **відрізняється** тим, що домен VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11.
13. Кон'югат антитіла за п. 11, який **відрізняється** тим, що домен VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.
14. Кон'югат антитіла за п. 11, який **відрізняється** тим, що антитіло містить: (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, і (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.
15. Кон'югат антитіла за п. 14, який **відрізняється** тим, що антитіло містить: (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48, і (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50.
16. Кон'югат антитіла за п. 14, який **відрізняється** тим, що антитіло містить: (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49, і (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50.
17. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 1-16, який **відрізняється** тим, що антитіло є моноклональним, людським, гуманізованим або химерним.
18. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 1-17, який **відрізняється** тим, що антитіло являє собою антигензв'язуючий фрагмент антитіла.

19. Кон'югат антитіла за п. 18, який **відрізняється** тим, що фрагмент антитіла вибирають з групи, що складається з фрагментів Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂.
20. Кон'югат антитіла за п. 19, який **відрізняється** тим, що фрагмент антитіла являє собою Fab або Fab-C.
- 5 21. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що антитіло являє собою моноспецифічне антитіло.
22. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що антитіло являє собою мультиспецифічне антитіло.
- 10 23. Кон'югат антитіла за п. 22, який **відрізняється** тим, що мультиспецифічне антитіло являє собою біспецифічне антитіло.
24. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 1-23, який **відрізняється** тим, що антитіло являє собою антитіло, сконструйоване введенням цистеїну (cysteine engineered).
25. Кон'югат антитіла за п. 24, який **відрізняється** тим, що антитіло, сконструйоване введенням цистеїну, містить цистеїнову мутацію у важкому ланцюзі, вибрану з групи, що складається з HC-A118C, HC-A140C і HC-L174C (нумерація EU), або цистеїнову мутацію у легкому ланцюзі, вибрану з групи, що складається з LCK149C і LC-V205C (нумерація за Кабатом).
- 15 26. Кон'югат антитіла за п. 25, який **відрізняється** тим, що цистеїнова мутація у важкому ланцюзі являє собою HC-A118C (нумерація EU).
27. Кон'югат антитіла за п. 25, який **відрізняється** тим, що цистеїнова мутація у важкому ланцюзі являє собою HC-A140C (нумерація EU).
- 20 28. Кон'югат антитіла за п. 25, який **відрізняється** тим, що цистеїнова мутація у важкому ланцюзі являє собою HC-L174C (нумерація EU).
29. Кон'югат антитіла за п. 25, який **відрізняється** тим, що цистеїнова мутація у легкому ланцюзі являє собою LC-K149C (нумерація за Кабатом).
- 25 30. Кон'югат антитіла за п. 25, який **відрізняється** тим, що цистеїнова мутація у легкому ланцюзі являє собою LC-V205C (нумерація за Кабатом).
31. Кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 25-30, який **відрізняється** тим, що полімер ГК ковалентно приєднаний до антитіла при цистеїновій мутації.
32. Кон'югат антитіла, що містить: (i) антитіло, яке специфічно зв'язується з ФРЕС, та (ii) полімер ГК, ковалентно зв'язаний з антитілом, який **відрізняється** тим, що полімер ГК має PDI 1,05 та молекулярну масу в межах від приблизно 100 до приблизно 250 кДа, і причому антитіло містить: (a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, та (b) домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.
- 30 33. Кон'югат антитіла, що містить: (i) антитіло, яке специфічно зв'язується з ФРЕС, та (ii) полімер ГК, ковалентно зв'язаний з антитілом, який **відрізняється** тим, що полімер ГК має PDI 1,05 та молекулярну масу в межах від приблизно 100 до приблизно 250 кДа, і причому антитіло містить: (a) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48 або SEQ ID NO: 49, та (b) легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50.
34. Застосування кон'югата антитіла за будь-яким з пп. 1-33 як лікарського засобу.
- 40 35. Застосування кон'югата антитіла за будь-яким з пп. 1-33 у виготовленні лікарського засобу для лікування захворювань очей у суб'єкта.
36. Застосування кон'югата антитіла за будь-яким з пп. 1-33 у зниженні або інгібуванні ангиогенезу у суб'єкта, що має захворювання очей.
37. Застосування кон'югата антитіла за будь-яким з пп. 1-33 в лікуванні захворювання очей у суб'єкта.
- 45 38. Застосування кон'югата антитіла за будь-яким з пп. 35-37, яке **відрізняється** тим, що захворювання очей вибирають із групи, що складається з вікової макулярної дегенерації (ВМД), макулодистрофії, макулярного набряку, діабетичного макулярного набряку (ДМН) (зокрема фокального нецентрального ДМН і дифузного центрального ДМН), ретинопатії, діабетичної ретинопатії (ДР) (зокрема проліферативної ДР (ПДР), непроліферативної ДР (НПДР) і високогірної ДР), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, ретинопатії недоношених (РН), оклюзії вени сітківки (ОВС) (зокрема форм оклюзії центральної вени сітківки (ОЦВС) і гілки центральної вени сітківки (ОГВС)), ХНВ (зокрема міопічної ХНВ), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією сітківки/хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної міопії, хвороби Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, сімейної ексудативної вітреоретинопатії (СЕВ), хвороби Коутса, хвороби Норрі, синдрому остеопорозу-псевдогліоми (OPPG), субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярних захворювань очей, неоваскулярної глаукоми, пігментного ретиніту (ПР), гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангиоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки,
- 60

внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, кістозного макулярного набряку (КМН), васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (зокрема інфекційного та неінфекційного (наприклад, алергічного) кон'юнктивіту), вродженого амаврозу Лебера, увеїту (зокрема інфекційного та неінфекційного увеїту), хоріоїдиту, гістоплазмозу очей, блефариту, синдрому сухого ока, травматичного пошкодження ока і синдрому Шегрена.

39. Застосування кон'югата антитіла за п. 38, яке **відрізняється** тим, що захворювання очей являє собою ВМД, ДМН, ДР або ОВС.

40. Застосування кон'югата антитіла за п. 38 або 39, яке **відрізняється** тим, що захворювання очей являє собою ВМД.

41. Застосування кон'югата антитіла за будь-яким з пп. 38-40, який **відрізняється** тим, що ВМД являє собою вологу ВМД.

42. Застосування кон'югата антитіла за п. 38 або 39, який **відрізняється** тим, що захворювання очей являє собою ДМН.

43. Фармацевтична композиція, яка містить кон'югат антитіла за будь-яким з пп. 1-33, і фармацевтично прийнятний носій, наповнювач або розчинник.

44. Спосіб зниження або інгібування ангіогенезу у суб'єкта, що має захворювання очей, який включає введення суб'єкту ефективної кількості кон'югата антитіла за будь-яким з пп. 1-33 або фармацевтичної композиції за п. 43, тим самим знижуючи або інгібуючи ангіогенез у суб'єкта.

45. Спосіб лікування захворювання очей, що включає введення ефективної кількості кон'югата антитіла за будь-яким з пп. 1-33 або фармацевтичної композиції за п. 43 суб'єкту, який потребує такого лікування.

46. Спосіб за п. 44 або 45, який **відрізняється** тим, що захворювання очей вибирають із групи, що складається з ВМД, макулодистрофії, макулярного набряку, ДМН (зокрема фокального нецентрального ДМН і дифузного центрального ДМН), ретинопатії, ДР (зокрема проліферативної ДР (ПДР), НПДР і високогірної ДР), інших пов'язаних з ішемією ретинопатій, РН, ОВС (зокрема форм оклюзії центральної вени сітківки (ОЦВС) і гілки центральної вени сітківки (ОГВС)), ХНВ (зокрема міопічної ХНВ), неоваскуляризації рогівки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією рогівки, неоваскуляризації сітківки, хвороби, пов'язаної з неоваскуляризацією сітківки/хоріоїдальною неоваскуляризацією, патологічної міопії, хвороби Гіппеля-Ліндау, гістоплазмозу очей, СЕВ, хвороби Коутса, хвороби Норрі, ОРРГ, субкон'юнктивального крововиливу, рубеозу, неоваскулярних захворювань очей, неоваскулярної глаукоми, ПР, гіпертонічної ретинопатії, ретинальної ангіоматозної проліферації, макулярної телеангіектазії, неоваскуляризації райдужки, внутрішньоочної неоваскуляризації, дегенерації сітківки, КМН, васкуліту, набряку диска зорового нерва, ретиніту, кон'юнктивіту (зокрема інфекційного та неінфекційного (наприклад, алергічного) кон'юнктивіту), вродженого амаврозу Лебера, увеїту (зокрема інфекційного та неінфекційного увеїту), хоріоїдиту, гістоплазмозу очей, блефариту, синдрому сухого ока, травматичного пошкодження ока і синдрому Шегрена.

47. Спосіб за п. 46, який **відрізняється** тим, що захворювання очей являє собою ВМД, ДМН, ДР або ОВС.

48. Спосіб за п. 46 або 47, який **відрізняється** тим, що захворювання очей являє собою ВМД.

49. Спосіб за будь-яким з пп. 46-48, який **відрізняється** тим, що ВМД являє собою вологу ВМД.

50. Спосіб за п. 46 або 47, який **відрізняється** тим, що захворювання очей являє собою ДМН.

51. Спосіб за будь-яким з пп. 44-50, який **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла або фармацевтичну композицію вводять інтравітреально, через око, інтраокулярно, у навколосклеральну область, у субтеноновий простір, у супрахоріоїдальний простір, місцево, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, інтрадермально, черезшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньочеревно, внутрішньовогнищево, інтракраніально, внутрішньосуглобово, внутрішньопростатно, внутрішньоплеврально, інтратрахеально, інтратекально, інтраназально, інтравагінально, ректально, місцево, внутрішньопухлинно, внутрішньочеревно, інтравентрикулярно, підшкірно, субкон'юнктивально, внутрішньоміхурно, через слизову оболонку, інтраперикардіально, внутрішньопуповинно, інтраорбітально, перорально, місцево, трансдермально, шляхом інгаляції, шляхом ін'єкції, у вигляді очних крапель, шляхом імплантації, шляхом інфузії, шляхом безперервної інфузії, шляхом локалізованої перфузії безпосередньо через клітини-мішені, за допомогою катетера, за допомогою лаважу, у кремах або в ліпідних композиціях.

52. Спосіб за п. 51, який **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла або фармацевтичну композицію вводять у склоподібне тіло, через око, інтраокулярно, у навколосклеральну область, у субтеноновий простір, у супрахоріоїдальний простір або місцево.

53. Спосіб за п. 51 або 52, який **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла або фармацевтичну композицію вводять шляхом ін'єкції в склоподібне тіло.
54. Спосіб за п. 51 або 52, який **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла або фармацевтичну композицію вводять місцево у вигляді очних крапель або мазі.
- 5 55. Спосіб за п. 51 або 52, який **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла або фармацевтичну композицію вводять за допомогою пристрою доставки, що імплантується.
56. Спосіб за будь-яким з пп. 44-55, який **відрізняється** тим, що суб'єкт являє собою людину.

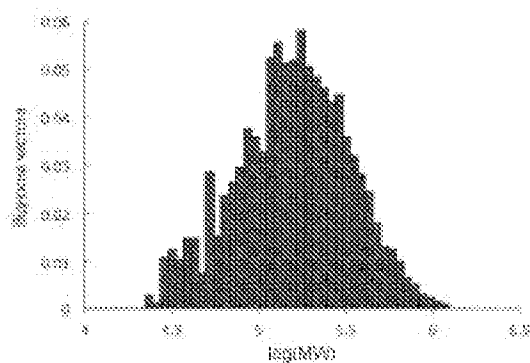


Fig. 1A

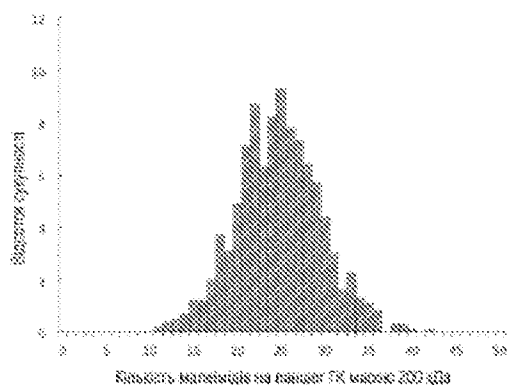
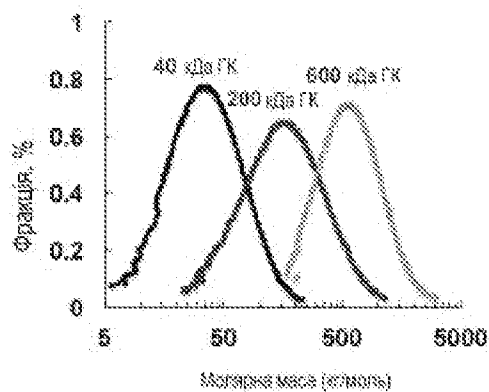


Fig. 1B



Назва зразка	M_n , кДа	M_w , кДа	PDI M_w/M_n	Діапазон MW, кДа
HA40K	29	46	1.58	10-110
HA200K	117	209	1.78	40-620
HA600K	470	662	1.41	210-1460

Fig. 1C

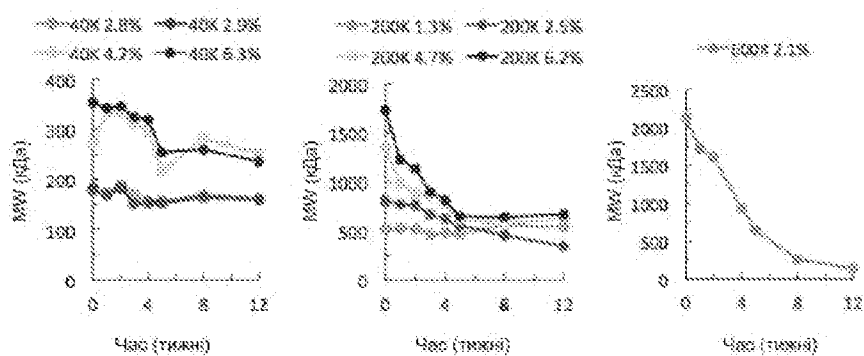


Fig. 2

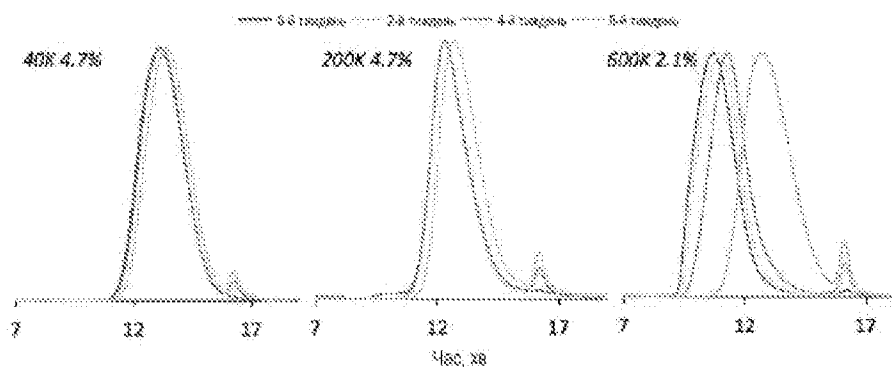
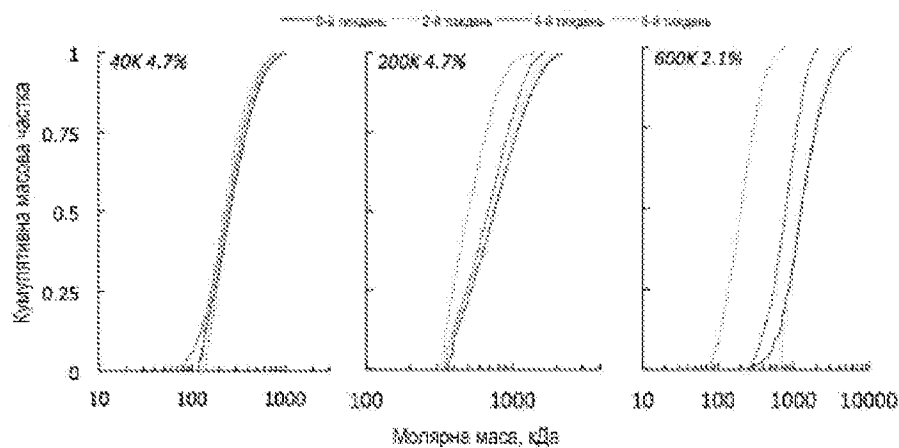
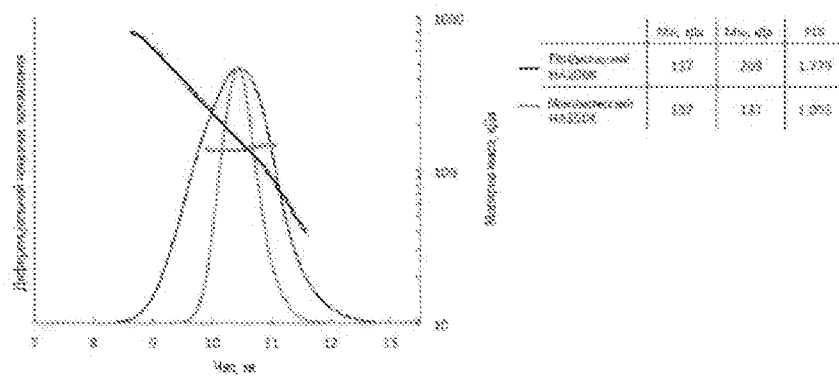


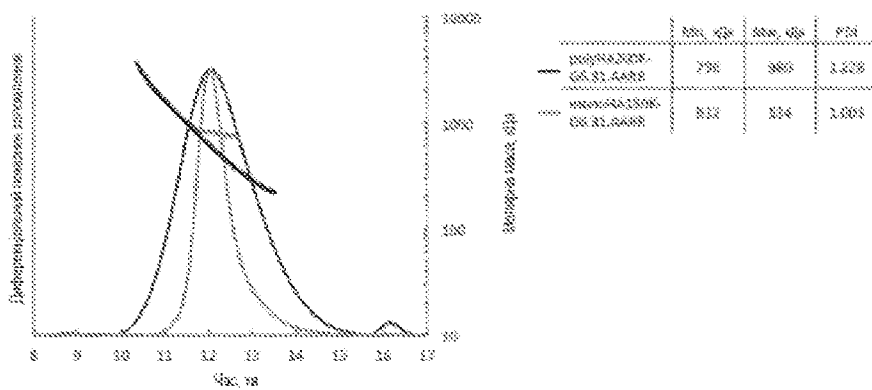
Fig. 3



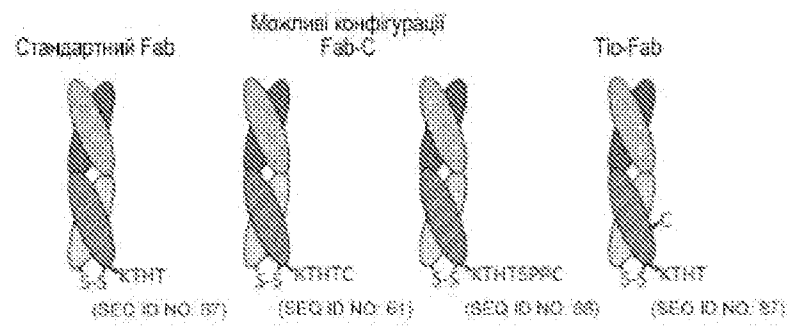
Фиг. 4



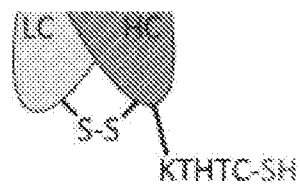
Фиг. 5



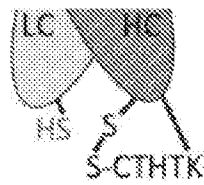
Фиг. 6



Фиг. 7



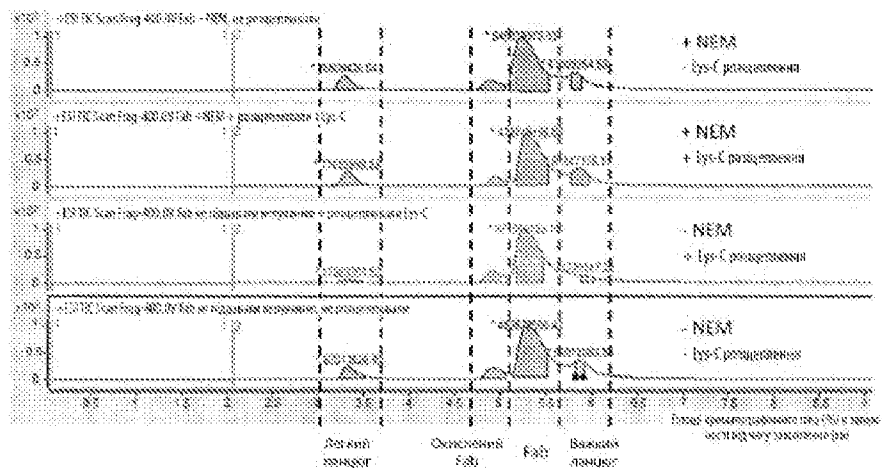
Фиг. 8A



Фиг. 8B



Фиг. 8C



Dir. 9

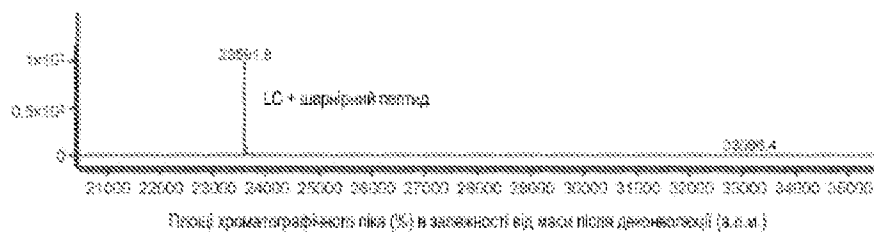


Fig. 10A

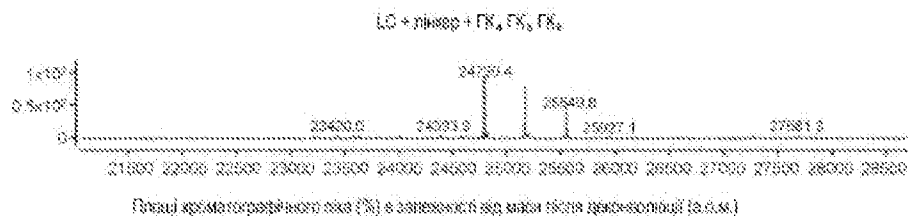


Fig. 10B

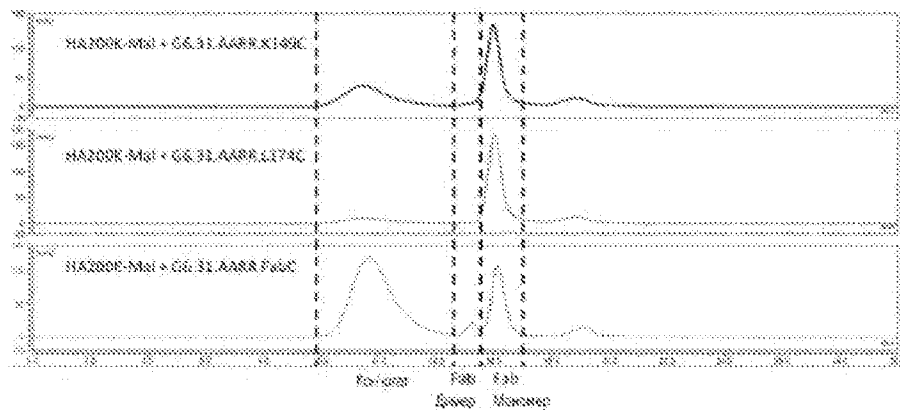
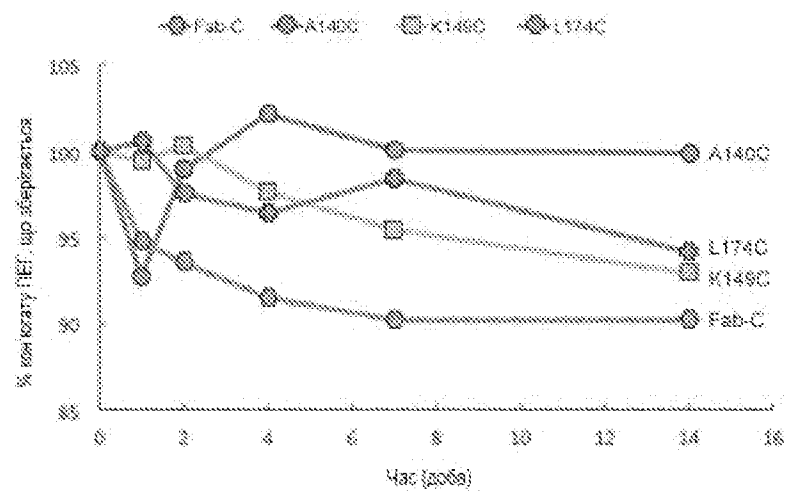


Fig. 11



Фиг. 12

Алфавит рус. яз.	№ позиции рус. алф.	Алфавит рус. яз.	№ позиции рус. алф.	Алфавит рус. яз.	№ позиции рус. алф.	Алфавит рус. яз.	№ позиции рус. алф.	Алфавит рус. яз.	№ позиции рус. алф.
А	1	С	19	Г	101	В	115	У	197
Б	2	Д	20	Д	102	Г	116	Ф	198
В	3	Е	21	Е	103	Д	117	Х	199
Г	4	Ж	22	Ж	104	Е	118	Ц	200
Д	5	З	23	З	105	Ж	119	Ч	201
Е	6	И	24	И	106	З	120	Ш	202
Ж	7	Й	25	Й	107	И	121	Щ	203
З	8	К	26	К	108	Й	122	Р	204
И	9	Л	27	Л	109	К	123	С	205
Й	10	М	28	М	110	Л	124	Т	206
К	11	Н	29	Н	111	М	125	Б	207
Л	12	О	30	О	112	Н	126	В	208
М	13	П	31	П	113	О	127	Г	209
Н	14	Р	32	Р	114	П	128	Д	210
О	15	С	33	С	115	Р	129	Е	211
П	16	Т	34	Т	116	С	130	Ж	212
Р	17	У	35	У	117	Т	131	З	213
С	18	Ф	36	Ф	118	У	132	И	214
Д	19	Х	37	Х	119	Ф	133	Й	215
Е	20	Ц	38	Ц	120	Х	134	К	216
Ж	21	Ч	39	Ч	121	Ц	135	Л	217
З	22	Ш	40	Ш	122	Ч	136	М	218
И	23	Щ	41	Щ	123	Ш	137	Н	219
Й	24	Р	42	Р	124	Щ	138	О	220
К	25	С	43	С	125	Р	139	П	221
Л	26	Т	44	Т	126	С	140	Р	222
М	27	У	45	У	127	Т	141	С	223
Н	28	Ф	46	Ф	128	У	142	Т	224
О	29	Х	47	Х	129	Ф	143	У	225
П	30	Ц	48	Ц	130	Х	144	Ф	226
Р	31	Ч	49	Ч	131	Ц	145	Х	227
С	32	Ш	50	Ш	132	Ч	146	Ц	228
Д	33	Щ	51	Щ	133	Ш	147	Ш	229
Е	34	Р	52	Р	134	Щ	148	В	230
Ж	35	С	53	С	135	Р	149	Г	231
З	36	Т	54	Т	136	С	150	Д	232
И	37	У	55	У	137	Т	151	Е	233
Й	38	Ф	56	Ф	138	У	152	Ж	234
К	39	Х	57	Х	139	Ф	153	З	235
Л	40	Ц	58	Ц	140	Х	154	И	236
М	41	Ч	59	Ч	141	Ц	155	Й	237
Н	42	Ш	60	Ш	142	Ч	156	К	238
О	43	Щ	61	Щ	143	Ш	157	Л	239
П	44	Р	62	Р	144	Щ	158	М	240
Р	45	С	63	С	145	Р	159	Н	241
С	46	Т	64	Т	146	С	160	О	242
Д	47	У	65	У	147	Т	161	П	243
Е	48	Ф	66	Ф	148	У	162	Р	244
Ж	49	Х	67	Х	149	Ф	163	С	245
З	50	Ц	68	Ц	150	Х	164	Т	246
И	51	Ч	69	Ч	151	Ц	165	У	247
Й	52	Ш	70	Ш	152	Ч	166	Ф	248
К	53	Щ	71	Щ	153	Ш	167	Х	249
Л	54	Р	72	Р	154	Щ	168	Ц	250
М	55	С	73	С	155	Р	169	Ш	251
Н	56	Т	74	Т	156	С	170	В	252
О	57	У	75	У	157	Т	171	Г	253
П	58	Ф	76	Ф	158	У	172	Д	254
Р	59	Х	77	Х	159	Ф	173	Е	255
С	60	Ц	78	Ц	160	Х	174	Ж	256
Д	61	Ч	79	Ч	161	Ц	175	З	257
Е	62	Ш	80	Ш	162	Ч	176	И	258
Ж	63	Щ	81	Щ	163	Ш	177	Й	259
З	64	Р	82	Р	164	Щ	178	К	260
И	65	С	83	С	165	Р	179	Л	261
Й	66	Т	84	Т	166	С	180	М	262
К	67	У	85	У	167	Т	181	Н	263
Л	68	Ф	86	Ф	168	У	182	О	264
М	69	Х	87	Х	169	Ф	183	П	265
Н	70	Ц	88	Ц	170	Х	184	Р	266
О	71	Ч	89	Ч	171	Ц	185	С	267
П	72	Ш	90	Ш	172	Ч	186	Т	268
Р	73	Щ	91	Щ	173	Ш	187	У	269
С	74	Р	92	Р	174	Щ	188	Ф	270
Д	75	С	93	С	175	Р	189	Х	271
Е	76	Т	94	Т	176	С	190	Ц	272
Ж	77	У	95	У	177	Т	191	Ш	273
З	78	Ф	96	Ф	178	У	192	В	274
И	79	Х	97	Х	179	Ф	193	Г	275
Й	80	Ц	98	Ц	180	Х	194	Д	276
К	81	Ч	99	Ч	181	Ц	195	Е	277
Л	82	Ш	100	Ш	182	Ч	196	Ж	278
М	83	Щ	101	Щ	183	Ш	197	З	279
Н	84	Р	102	Р	184	Щ	198	И	280
О	85	С	103	С	185	Р	199	Й	281
П	86	Т	104	Т	186	С	200	К	282
Р	87	У	105	У	187	Т	201	Л	283
С	88	Ф	106	Ф	188	У	202	М	284
Д	89	Х	107	Х	189	Ф	203	Н	285
Е	90	Ц	108	Ц	190	Х	204	О	286
Ж	91	Ч	109	Ч	191	Ц	205	П	287
З	92	Ш	110	Ш	192	Ч	206	Р	288
И	93	Щ	111	Щ	193	Ш	207	С	289
Й	94	Р	112	Р	194	Щ	208	Т	290
К	95	С	113	С	195	Р	209	У	291
Л	96	Т	114	Т	196	С	210	Ф	292
М	97	У	115	У	197	Т	211	Х	293
Н	98	Ф	116	Ф	198	У	212	Ц	294
О	99	Х	117	Х	199	Ф	213	Ш	295
П	100	Ц	118	Ц	200	Х	214	В	296
Р	101	Ч	119	Ч	201	Ц	215	Г	297
С	102	Ш	120	Ш	202	Ч	216	Д	298
Д	103	Щ	121	Щ	203	Ш	217	Е	299
Е	104	Р	122	Р	204	Щ	218	Ж	300
Ж	105	С	123	С	205	Р	219	З	301
З	106	Т	124	Т	206	С	220	И	302
И	107	У	125	У	207	Т	221	Й	303
Й	108	Ф	126	Ф	208	У	222	К	304
К	109	Х	127	Х	209	Ф	223	Л	305
Л	110	Ц	128	Ц	210	Х	224	М	306
М	111	Ч	129	Ч	211	Ц	225	Н	307
Н	112	Ш	130	Ш	212	Ч	226	О	308
О	113	Щ	131	Щ	213	Ш	227	П	309
П	114	Р	132	Р	214	Щ	228	Р	310
Р	115	С	133	С	215	Р	229	С	311
С	116	Т	134	Т	216	С	230	Т	312
Д	117	У	135	У	217	Т	231	У	313
Е	118	Ф	136	Ф	218	У	232	Ф	314
Ж	119	Х	137	Х	219	Ф	233	Х	315
З	120	Ц	138	Ц	220	Х	234	Ц	316
И	121	Ч	139	Ч	221	Ц	235	Ш	317
Й	122	Ш	140	Ш	222	Ш	236	В	318
К	123	Щ	141	Щ	223	Щ	237	Г	319
Л	124	Р	142	Р	224	Р	238	Д	320
М	125	С	143	С	225	С	239	Е	321
Н	126	Т	144	Т	226	Т	240	Ж	322
О	127	У	145	У	227	У	241	З	323
П	128	Ф	146	Ф	228	Ф	242	И	324
Р	129	Х	147	Х	229	Х	243	Й	325
С	130	Ц	148	Ц	230	Ц	244	К	326
Д	131	Ч	149	Ч	231	Ч	245	Л	327
Е	132	Ш	150	Ш	232	Ш	246	М	328
Ж	133	Щ	151	Щ	233	Щ	247	Н	329
З	134	Р	152	Р	234	Р	248	О	330
И	135	С	153	С	235	С	249	П	331
Й	136	Т	154	Т	236	Т	250	Р	332
К	137	У	155	У	237	У	251	С	333
Л	138	Ф	156	Ф	238	Ф	252	Т	334
М	139	Х	157	Х	239	Х	253	У	335
Н	140	Ц	158	Ц	240	Ц	254	Ф	336
О	141	Ч	159	Ч	241	Ч	255	Х	337
П	142	Ш	160	Ш	242	Ш	256	Ц	338
Р	143	Щ	161	Щ	243	Щ	257	Ш	339
С	144	Р	162	Р	244	Р	258	В	340
Д	145	С	163	С	245	С	259	Г	341
Е	146	Т	164	Т	246	Т	260	Д	342
Ж	147	У	165	У	247	У	261	Е	343
З	148	Ф	166	Ф	248	Ф	262	Ж	344
И	149	Х	167	Х	249	Х	263	З	345
Й	150	Ц	168	Ц	250	Ц	264	И	346
К	151	Ч	169	Ч	251	Ч	265	Й	347
Л	152	Ш	170	Ш	252	Ш	266	К	348
М	153	Щ	171	Щ	253	Щ	267	Л	349
Н	154	Р	172	Р	254	Р	268	М	350
О	155	С	173	С	255	С	269	Н	351
П	156	Т	174	Т	256	Т	270	О	352
Р	157	У	175	У	257	У	271	П	353
С	158	Ф	176	Ф	258	Ф	272	Р	354
Д	159	Х	177	Х	259	Х	273	С	355
Е	160	Ц	178	Ц	260	Ц	274	Д	356
Ж	161	Ч	179	Ч	261	Ч	275	Е	357
З	162	Ш	180	Ш	262	Ш	276	Ж	358
И	163	Щ	181	Щ	263	Щ	277	З	359
Й	164	Р	182	Р	264	Р	278	И	360
К	165	С	183	С	265	С	279		

Алфавит латин.	Р. код латин.	Р. код латин.	Р. код латин.
A	1	1	
C	2	2	
G	3	3	
L	4	4	
N	5	5	2
P	6	6	3
B	7	7	3
M	8	8	5
Q	9	9	6
C	10	10	7
L	11	11	8
S	12	12	9
G	13	13	10
P	14	14	11
C	15	15	12
G	16	16	13
S	17	17	14
L	18	18	15
B	19	19	16
L	20	20	17
B	21	21	18
C	22	22	19
A	23	23	20
A	24	24	21
S	25	25	22
C	26	26	23
P	27	27	24
K	28	28	25
L	29	29	26
S	30	30	27
D	31	31	28
E	32	32	29
V	33	33	30
L	34	34	31
B	35	35	32
B	36	36	33
V	37	37	34
B	38	38	35
G	39	39	36
A	40	40	37
P	41	41	38
C	42	42	39
K	43	43	40
C	44	44	41
L	45	45	42
E	46	46	43
W	47	47	44
V	48	48	45
A	49	49	46
K	50	50	47
L	51	51	48
N	52	52	49
P	53	53	50

Алфавит латин.	Р. код латин.	Р. код латин.	Р. код латин.
T	54	54	51
B	55	55	52
C	56	56	53
V	57	57	54
T	58	58	55
E	59	59	56
V	60	60	57
A	61	61	58
D	62	62	59
S	63	63	60
V	64	64	61
K	65	65	62
C	66	66	63
K	67	67	64
P	68	68	65
T	69	69	66
L	70	70	67
E	71	71	68
A	72	72	69
C	73	73	70
T	74	74	71
S	75	75	72
K	76	76	73
N	77	77	74
T	78	78	75
A	79	79	76
V	80	80	77
L	81	81	78
G	82	82	79
M	83	83	80
N	84	84	81
E	85	85	82
L	86	86	83
P	87	87	84
A	88	88	85
D	89	89	86
T	90	90	87
V	91	91	88
A	92	92	89
V	93	93	90
V	94	94	91
T	95	95	92
C	96	96	93
K	97	97	94
K	98	98	95
C	99	99	96
P	100	100	97
C	101	101	98
D	102	102	99
C	103	103	100
P	104	104	101
V	105	105	102
A	106	106	103

Алфавит латин.	Р. код латин.	Р. код латин.	Р. код латин.
M	107	107	104
D	108	108	105
V	109	109	106
W	110	110	107
C	111	111	108
G	112	112	109
C	113	113	110
T	114	114	111
L	115	115	112
V	116	116	113
T	117	117	114
V	118	118	115
S	119	119	116
D	120	120	117
A	121	121	118
Z	122	122	119
T	123	123	120
K	124	124	121
C	125	125	122
P	126	126	123
S	127	127	124
V	128	128	125
T	129	129	126
P	130	130	127
L	131	131	128
A	132	132	129
P	133	133	130
L	134	134	131
S	135	135	132
E	136	136	133
B	137	137	134
T	138	138	135
S	139	139	136
C	140	140	137
L	141	141	138
T	142	142	139
A	143	143	140
L	144	144	141
C	145	145	142
C	146	146	143
C	147	147	144
L	148	148	145
L	149	149	146
V	150	150	147
E	151	151	148
V	152	152	149
E	153	153	150
V	154	154	151
T	155	155	152
V	156	156	153

Фиг. 13Б

Адресная зона ИС	И-1000 показатель дБм	И-1000 показатель дБм	И-1000 показатель дБм
U	100	101	102
W	101	102	103
N	102	103	104
S	103	104	105
O	104	105	106
A	105	106	107
L	106	107	108
E	107	108	109
S	108	109	110
O	109	110	111
V	110	111	112
H	111	112	113
T	112	113	114
P	113	114	115
P	114	115	116
A	115	116	117
V	116	117	118
C	117	118	119
O	118	119	120
B	119	120	121
S	120	121	122
O	121	122	123
L	122	123	124
V	123	124	125
Z	124	125	126
L	125	126	127
S	126	127	128
N	127	128	129
O	128	129	130
V	129	130	131
Y	130	131	132
E	131	132	133
O	132	133	134
S	133	134	135
N	134	135	136
S	135	136	137
L	136	137	138
T	137	138	139
T	138	139	140
O	139	140	141
C	140	141	142
Y	141	142	143
L	142	143	144
C	143	144	145
N	144	145	146
V	145	146	147
N	146	147	148
C	147	148	149
K	148	149	150
O	149	150	151
C	150	151	152
Y	151	152	153
L	152	153	154
C	153	154	155
N	154	155	156
V	155	156	157
N	156	157	158
C	157	158	159
K	158	159	160
V	159	160	161
O	160	161	162
S	161	162	163
N	162	163	164
T	163	164	165

Адресная зона ИС	И-1000 показатель дБм	И-1000 показатель дБм	И-1000 показатель дБм
U	211	212	213
V	212	213	214
O	213	214	215
K	214	215	216
K	215	216	217
V	216	217	218
E	217	218	219
P	218	219	220
K	219	220	221
S	220	221	222
C	221	222	223
O	222	223	224
O	223	224	225
D	224	225	226
E	225	226	227
P	226	227	228
H	227	228	229
P	228	229	230
C	229	230	231
O	230	231	232
P	231	232	233
C	232	233	234
O	233	234	235
A	234	235	236
P	235	236	237
E	236	237	238
L	237	238	239
L	238	239	240
C	239	240	241
O	240	241	242
P	241	242	243
S	242	243	244
V	243	244	245
P	244	245	246
L	245	246	247
L	246	247	248
C	247	248	249
O	248	249	250
K	249	250	251
P	250	251	252
E	251	252	253
O	252	253	254
P	253	254	255
L	254	255	256
O	255	256	257
K	256	257	258
V	257	258	259
V	258	259	260
C	259	260	261
O	260	261	262
S	261	262	263
N	262	263	264
V	263	264	265
N	264	265	266
C	265	266	267
K	266	267	268
V	267	268	269
O	268	269	270
S	269	270	271
N	270	271	272
C	271	272	273
K	272	273	274
V	273	274	275
N	274	275	276
C	275	276	277
K	276	277	278
V	277	278	279
O	278	279	280
S	279	280	281
N	280	281	282
T	281	282	283

Адресная зона ИС	И-1000 показатель дБм	И-1000 показатель дБм	И-1000 показатель дБм
V	316	317	318
V	317	318	319
O	318	319	320
V	319	320	321
S	320	321	322
H	321	322	323
C	322	323	324
O	323	324	325
D	324	325	326
E	325	326	327
O	326	327	328
V	327	328	329
K	328	329	330
O	329	330	331
C	330	331	332
O	331	332	333
V	332	333	334
K	333	334	335
O	334	335	336
V	335	336	337
K	336	337	338
O	337	338	339
S	338	339	340
N	339	340	341
V	340	341	342
K	341	342	343
O	342	343	344
S	343	344	345
N	344	345	346
T	345	346	347

Фиг. 13В (ПРОДОВЖЕННЯ)

Адреса: адрес Н	В'ємк. адреса за адрес	В'ємк. адреса за адрес	В'ємк. адреса за адрес
А	100	100	100
В	101	101	101
С	102	102	102
Д	103	103	103
Е	104	104	104
Ж	105	105	105
З	106	106	106
И	107	107	107
Й	108	108	108
К	109	109	109
Л	110	110	110
М	111	111	111
Н	112	112	112
О	113	113	113
П	114	114	114
Р	115	115	115
С	116	116	116
Т	117	117	117
У	118	118	118
Ф	119	119	119
Х	120	120	120
Ц	121	121	121
Ч	122	122	122
Ш	123	123	123
Щ	124	124	124
Ъ	125	125	125
Ы	126	126	126
Ь	127	127	127
Э	128	128	128
Ю	129	129	129
Я	130	130	130
а	131	131	131
б	132	132	132
в	133	133	133
г	134	134	134
д	135	135	135
е	136	136	136
ж	137	137	137
з	138	138	138
и	139	139	139
й	140	140	140
к	141	141	141
л	142	142	142
м	143	143	143
н	144	144	144
о	145	145	145
п	146	146	146
р	147	147	147
с	148	148	148
т	149	149	149
у	150	150	150
ф	151	151	151
х	152	152	152
ц	153	153	153
ч	154	154	154
ш	155	155	155
щ	156	156	156
ъ	157	157	157
ы	158	158	158
ь	159	159	159
э	160	160	160
ю	161	161	161
я	162	162	162
а	163	163	163
б	164	164	164
в	165	165	165
г	166	166	166
д	167	167	167
е	168	168	168
ж	169	169	169
з	170	170	170
и	171	171	171
й	172	172	172
к	173	173	173
л	174	174	174
м	175	175	175
н	176	176	176
о	177	177	177
п	178	178	178
р	179	179	179
с	180	180	180
т	181	181	181
у	182	182	182
ф	183	183	183
х	184	184	184
ц	185	185	185
ч	186	186	186
ш	187	187	187
щ	188	188	188
ъ	189	189	189
ы	190	190	190
ь	191	191	191
э	192	192	192
ю	193	193	193
я	194	194	194
а	195	195	195
б	196	196	196
в	197	197	197
г	198	198	198
д	199	199	199
е	200	200	200
ж	201	201	201
з	202	202	202
и	203	203	203
й	204	204	204
к	205	205	205
л	206	206	206
м	207	207	207
н	208	208	208
о	209	209	209
п	210	210	210
р	211	211	211
с	212	212	212
т	213	213	213
у	214	214	214
ф	215	215	215
х	216	216	216
ц	217	217	217
ч	218	218	218
ш	219	219	219
щ	220	220	220
ъ	221	221	221
ы	222	222	222
ь	223	223	223
э	224	224	224
ю	225	225	225
я	226	226	226
а	227	227	227
б	228	228	228
в	229	229	229
г	230	230	230
д	231	231	231
е	232	232	232
ж	233	233	233
з	234	234	234
и	235	235	235
й	236	236	236
к	237	237	237
л	238	238	238
м	239	239	239
н	240	240	240
о	241	241	241
п	242	242	242
р	243	243	243
с	244	244	244
т	245	245	245
у	246	246	246
ф	247	247	247
х	248	248	248
ц	249	249	249
ч	250	250	250
ш	251	251	251
щ	252	252	252
ъ	253	253	253
ы	254	254	254
ь	255	255	255
э	256	256	256
ю	257	257	257
я	258	258	258
а	259	259	259
б	260	260	260
в	261	261	261
г	262	262	262
д	263	263	263
е	264	264	264
ж	265	265	265
з	266	266	266
и	267	267	267
й	268	268	268
к	269	269	269
л	270	270	270
м	271	271	271
н	272	272	272
о	273	273	273
п	274	274	274
р	275	275	275
с	276	276	276
т	277	277	277
у	278	278	278
ф	279	279	279
х	280	280	280
ц	281	281	281
ч	282	282	282
ш	283	283	283
щ	284	284	284
ъ	285	285	285
ы	286	286	286
ь	287	287	287
э	288	288	288
ю	289	289	289
я	290	290	290
а	291	291	291
б	292	292	292
в	293	293	293
г	294	294	294
д	295	295	295
е	296	296	296
ж	297	297	297
з	298	298	298
и	299	299	299
й	300	300	300
к	301	301	301
л	302	302	302
м	303	303	303
н	304	304	304
о	305	305	305
п	306	306	306
р	307	307	307
с	308	308	308
т	309	309	309
у	310	310	310
ф	311	311	311
х	312	312	312
ц	313	313	313
ч	314	314	314
ш	315	315	315
щ	316	316	316
ъ	317	317	317
ы	318	318	318
ь	319	319	319
э	320	320	320
ю	321	321	321
я	322	322	322
а	323	323	323
б	324	324	324
в	325	325	325
г	326	326	326
д	327	327	327
е	328	328	328
ж	329	329	329
з	330	330	330
и	331	331	331
й	332	332	332
к	333	333	333
л	334	334	334
м	335	335	335
н	336	336	336
о	337	337	337
п	338	338	338
р	339	339	339
с	340	340	340
т	341	341	341
у	342	342	342
ф	343	343	343
х	344	344	344
ц	345	345	345
ч	346	346	346
ш	347	347	347
щ	348	348	348
ъ	349	349	349
ы	350	350	350
ь	351	351	351
э	352	352	352
ю	353	353	353
я	354	354	354
а	355	355	355
б	356	356	356
в	357	357	357
г	358	358	358
д	359	359	359
е	360	360	360
ж	361	361	361
з	362	362	362
и	363	363	363
й	364	364	364
к	365	365	365
л	366	366	366
м	367	367	367
н	368	368	368
о	369	369	369
п	370	370	370
р	371	371	371
с	372	372	372
т	373	373	373
у	374	374	374
ф	375	375	375
х	376	376	376
ц	377	377	377
ч	378	378	378
ш	379	379	379
щ	380	380	380
ъ	381	381	381
ы	382	382	382
ь	383	383	383
э	384	384	384
ю	385	385	385
я	386	386	386
а	387	387	387
б	388	388	388
в	389	389	389
г	390	390	390
д	391	391	391
е	392	392	392
ж	393	393	393
з	394	394	394
и	395	395	395
й	396	396	396
к	397	397	397
л	398	398	398
м	399	399	399
н	400	400	400
о	401	401	401
п	402	402	402
р	403	403	403
с	404	404	404
т	405	405	405
у	406	406	406
ф	407	407	407
х	408	408	408
ц	409	409	409
ч	410	410	410
ш	411	411	411
щ	412	412	412
ъ	413	413	413
ы	414	414	414
ь	415	415	415
э	416	416	416
ю	417	417	417
я	418	418	418
а	419	419	419
б	420	420	420
в	421	421	421
г	422	422	422
д	423	423	423
е	424	424	424
ж	425	425	425
з	426	426	426
и	427	427	427
й	428	428	428
к	429	429	429
л	430	430	430
м	431	431	431
н	432	432	432
о	433	433	433
п	434	434	434
р	435	435	435
с	436	436	436
т	437	437	437
у	438	438	438
ф	439	439	439
х	440	440	440
ц	441	441	441
ч	442	442	442
ш	443	443	443
щ	444	444	444
ъ	445	445	445
ы	446	446	446
ь	447	447	447
э	448	448	448
ю	449		