



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122771** (13) **C2**

(51) МПК (2021.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 35/00

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

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2017 00707	(72) Винахідник(и):	Вест Тим (US),
(22) Дата подання заявки:	26.06.2015		Атгвал Дилджит С. (GB),
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	07.01.2021		Джоунз Тимоті Д. (GB),
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/018,436, 62/080,903, 62/170,036		Кар Френсис Дж. (GB),
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	27.06.2014, 17.11.2014, 02.06.2015	(73) Володілець (володільці):	Голгейт Роберт Джордж Едвард (GB)
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US	(74) Представник:	Опанасенко Ольга Сергіївна, реєстр. №471
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.05.2017, Бюл.№ 10	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2013295021 A1, 07.11.2013 WO 2014008404 A1, 09.01.2014 US 2013136735 A1, 30.05.2013 WO 2014028777 A2, 20.02.2014 YANAMANDRA et al. Anti-tau antibodies that block tau aggregate seeding in vitro markedly decrease pathology and improve cognition in vivo. Neuron, 2013, Vol. 80, P. 402 – 414
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	06.01.2021, Бюл.№ 1		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2015/038002, 26.06.2015		

(54) ГУМАНІЗОВАНЕ АНТИ-ТАУ АНТИТІЛО

(57) Реферат:

Винахід стосується виділеного антитіла або антигензв'язувального фрагмента, який специфічно зв'язується з тау.

UA 122771 C2

ПЕРЕХРЕСНІ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

[0001] Надана заявка претендує на пріоритет згідно з 35 U.S.C. 119(e) заявки на патент США 62/170,036, поданої 2 червня 2015, заявки на патент США 62/080,903, поданої 17 листопада 2014, і заявки на патент США 62/018,436, поданої 27 червня 2014, зміст яких включений у цей опис в усій своїй повноті як посилання.

ВКЛЮЧЕННЯ СПИСКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

[0002] Матеріали у списку послідовностей, що додається, включені у обсязі даної заявки у вигляді посилання. Текстовий файл списку послідовностей, що додається, який має назву: C2N1_120_4WO_Sequence_L1st1ng, створений 26 червня 2015, і його розмір становить 9 Кбіт. Доступ до цього файлу можна одержати, використовуючи Microsoft Word на комп'ютері, керованому операційною системою Windows.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

[0003] Наданий винахід належить до галузі гуманізованих антитіл і їх антиген-зв'язувальних фрагментів, які зв'язуються з тау, і способів застосування таких антитіл для лікування таупатій. Зокрема, наданий винахід належить до гуманізованого антитіла і його антиген-зв'язувальним фрагментам, які зв'язуються з конкретними епітопами тау і запобігають поширенню тау.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

[0004] Таупатії мають одну спільну властивість, яка полягає у накопичуванні у головному мозку нерозчинного гіперфосфорильованого білка тау. Більше 20 різних нейродегенеративних порушень характеризуються певним ступенем нейрофібрилярної дегенерації і можуть бути віднесені до таупатій (Williams, 2006). Для класичних таупатій, таких як прогресуючий над'ядерний параліч (ПНП, PSP) і кортикобазальна дегенерація (КБД, CBD), характерні тау включення у вигляді одиничного або множинних осередків ураження центральної нервової системи. Класичні таупатії відрізняються від інших видів таупатій, при яких тау агрегати присутні спільно з іншими нейропатологічними ознаками, такими як бета-амілоїдні (Aβ) бляшки, які спостерігаються під час хвороби Альцгеймера (ХА), або тільця Леві, які спостерігаються під час хвороби Паркінсона (ХП). При таких некласичних видах таупатій питання про те, чи є тау патологія первинним фактором, що стимулює розвиток захворювання, або вона вторинна відносно неправильного укладання іншого білка і нейродегенерації, стає ще більше невизначеним.

[0005] Прогресуючий над'ядерний параліч (ПНП, також відомий як синдром Стіла-Річардсона-Ольшевського) являє собою прогресуюче нейродегенеративне порушення, частота виникнення якого, судячи з оцінок, становить 5-7 випадків на 100000 людей (Golbe, 2014). В США цим захворюванням уражені приблизно 20000 людей. У частоті ПНП не виявлено ніяких видимих географічних, етнічних, статевих або расових відмінностей. На ранній стадії, ПНП може мати клінічні симптоми, схожі з симптомами інших розладів мозкової діяльності, включаючи ідіопатичну хворобу Паркінсона. З цієї причини, постановка правильного діагнозу ПНП можлива через якийсь час, як правило, через 1-3 роки після першої появи клінічних симптомів. Симптоми найчастіше починають проявлятися у віці від 50 до 70 років, і незважаючи на відмінності, які спостерігаються у клінічній картині перебігу хвороби, тривалість життя з моменту появи симптомів звичайно становить від 5 до 9 років (Houghton, 2007). Хоча клінічна картина гетерогенна, найбільш звичайним і початково описаним синдромом ПНП, який нині називається синдромом Річардсона, є наявність вираженої постуральної нестабільності і ригідності осової мускулатури, що призводить до падінь, над'ядерного паралічу зору, що викликає ряд зорових порушень, лобовопідкіркової деменції і дисфагії, що призводить до аспірації. Захворювання є прогресуючим і завжди зі смертельним кінцем (Williams and Lees, 2009).

[0006] Патологічно, ПНП характеризується аномальним накопичуванням гіперфосфорильованих нерозчинних агрегатів білка тау у нейронах і глії у ствольній частині головного мозку, мозочку, базальних гангліях і корі головного мозку (Williams and Lees, 2009). Ступінь і розподіл агрегатів тау при ПНП сильно корелює з симптоматикою цього захворювання впродовж життя (Schofield et al., 2012). Наукові критерії національного інституту неврологічних розладів і товариства прогресуючого над'ядерного паралічу (NINDS-SPSP), які описують синдром Річардсона, дозволяють з високим ступенем достовірності передбачати патологію, яка лежить в основі ПНП (Litvan et al., 1996). Утворення нейрофібрилярних клубків (НФК, NFT), які складаються з агрегатів тау, супроводжується втратою нейронів у різних ділянках мозку. Виникають численні порушення нейротрансмітерів, а також, порушення, що зачіпають конкретні дофамінергічну, холінергічну, ГАМК-ергічну і норадренергічну системи.

[0007] У теперішній час відсутнє ухвалене лікування ПНП (Stamelou et al., 2010). Негативні результати, одержані під час вивчення ефективності лікування ПНП, виключають можливість

рекомендації емпірично обґрунтованої стандартної терапії (Boxer et al., 2014). За відсутності будь-якої ефективної нейропротективної і хвороба-модифікувальної терапії, є нагальна незадоволена медична потреба у методах лікування ПНП.

[0008] Хвороба Альцгеймера (ХА) являє собою загальне хронічне прогресуюче нейродегенеративне захворювання, під час якої відбувається необоротна втрата когнітивних і поведінкових функцій. Захворювання може розвиватися впродовж більше 10 років від слабо виражених симптомів до дуже серйозних проявів. Слід зазначити, що ХА вражає приблизно 10 % населення у віці старше 65 років і більше 30 % населення у віці старше 80 років. Сама хвороба Альцгеймера патологічно проявляється у вигляді позаклітинних амілоїдних бляшок і внутрішньоклітинних нейрофібрилярних клубків. Нейрофібрилярні клубки складаються, наприклад, з білка тау, зв'язує мікротрубочки, який збирається у спарених спіральних і прямих філаментах. Було висловлено припущення, що ці структури можуть бути функціонально зв'язані між собою, хоча не ясні механізми, за допомогою яких амілоїдне відкладення сприяє патологічному збиранню тау у філаменти, або навпаки.

[0009] Внутрішньоклітинні нейрофібрилярні структури під час таупатій (нейрофібрилярні клубки, дистрофічні неврити і нейропільні нитки) мають спарені спіральні філаменти (ССФ). Основна субодиниця білка у ССФ являє собою асоційований з мікротрубочками білок тау у аномально гіперфосфорильованій формі. Нейрони з нейрофібрилярними змінами вироджуються, і ступінь цього виродження прямо корелює зі ступенем деменції у уражених індивідуумів.

[0010] Інші види таупатій, про які відомо, що вони мають філаментні клітинні включення, що містять асоційований з мікротрубочками білок тау, включають хворобу Піку (ХПі), групу споріднених розладів під спільною назвою лобово-скронева деменція з паркінсонізмом, пов'язаним з хромосомою 17 (ЛСДП-17), аміотрофічний бічний склероз (АБС), хворобу Крейтцфельда-Якоба (ХКЯ), деменцію боксерів (ДБ), синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера (СГШШ), хвороба тілець Леві, хронічну травматичну енцефалопатію (ХТЕ) і хворобу Хантінгтона. Попри те, що етіологія, клінічні симптоми, патологічні відхилення і біохімічний склад філаментних клітинних включень під час цих захворювань різні, є свідчення на користь припущення про те, що механізми, які беруть участь у агрегації нормальних клітинних білків з утворенням різних філаментних включень є аналогічними. Вважається, що однією з ключових особливостей є первинна зміна у конформації асоційованого з мікротрубочками білка тау, яка ініціює утворення ядер або зерен для збирання у філаменти. Цей процес може бути обумовлений посттрансляційною модифікацією нормальних білків, мутацією або делецією у визначених генах і факторами, які зв'язуються з нормальними білками і, таким чином, змінюють їх конформацію.

СУТЬ ВИНАХОДУ

[0011] Як один з аспектів наданого винаходу надається виділене антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент, які специфічно зв'язуються з білком тау. Антитіло або фрагмент містять варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH) і варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), і кожна з ділянок VH і VL має послідовність, вибрану з амінокислотних послідовностей, приведених на фіг. 1 і 2. Більш конкретно, ділянка VL може мати амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1, 2, 3 і 4 [VK1, VK2, VK3 і VK4], а ділянка VH може мати амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 5, 6, 7 і 8 [VH1, VH2, VH3 і VH4]. У деяких варіантах здійснення наданого винаходу ділянка VL має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 [VK2], а ділянка VH має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5 [VH1]. У деяких варіантах здійснення антитіло містить Fc-фрагмент, який може бути людським IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 або їх варіантами, такими як людський IgG4, що містить мутацію S241P, яка стабілізує шарнірну ділянку. Антитіло може містити константну ділянку легкого ланцюга людського каппа-ізоотопу або її варіанти. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло або фрагмент є ScFv або Fab. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло або фрагмент є гуманізованим антитілом або фрагментом або химерним антитілом або фрагментом. Антитіло або фрагмент можуть являти собою моноклональне антитіло. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло або фрагмент конкурують з HJ8.5 за специфічне зв'язування з людським білком тау. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло або фрагмент зв'язуються з людським білком тау з рівноважною константою дисоціації (Kd), яка дорівнює щонайменше 10^{-4} M.

[0012] Як інший аспект наданого винаходу надається мультиспецифічне антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент, які мають множину антиген-зв'язувальних ділянок. Щонайменше одна антиген-зв'язувальна ділянка мультиспецифічного антитіла або фрагмента зв'язується з людським білком тау. Як альтернатива надається біспецифічне антитіло або

антиген-зв'язувальний фрагмент, які мають дві антиген-зв'язувальні ділянки. Одна з антиген-зв'язувальних ділянок біспецифічного антитіла або фрагмента зв'язується з людським білком тау. Як альтернатива, надається біспецифічне антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент, де одне плече антитіла або антиген-зв'язувального фрагмента конкурує з HJ8.5 за специфічне зв'язування з людським білком тау. Як альтернатива, надається біспецифічне антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент, де одне плече антитіла або антиген-зв'язувального фрагмента складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) і варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL), причому кожна з ділянок VH і VL має послідовність, вибрану з амінокислотних послідовностей, приведених на фіг. 1 і 2.

[0013] Будь-яке зі згаданих вище антитіл або антигензв'язувальних фрагментів може додатково містити токсичне навантаження, необов'язково кон'югат лікарського засобу або радіонуклід.

[0014] Як ще один аспект наданого винаходу надається виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує будь-яке зі згаданих вище антитіл або антиген-зв'язувальний фрагмент, або ділянку VH, або ділянку VL, приведені на Фіг. 1 або 2. Може бути наданий вектор (наприклад, експресуючий вектор), який містить таку молекулу нуклеїнової кислоти. Може бути надана виділена клітина-хазяїн, яка містить такий вектор. Може бути надана прокаріотична або еукаріотична клітина-хазяїн, така як клітина ссавця.

[0015] Як інший аспект наданого винаходу надається фармацевтична композиція. Фармацевтична композиція містить будь-що зі згаданих вище антитіл або антиген-зв'язувальних фрагментів, або молекулу нуклеїнової кислоти, як описано у наданій заявці, і фармацевтично прийнятний носій.

[0016] Як ще один аспект наданого винаходу надається виділена амінокислотна послідовність, яка містить послідовність одного з легких ланцюгів, приведених на Фіг. 1 і 2. Як альтернатива або додатково надається виділена амінокислотна послідовність, яка містить послідовність одного з важких ланцюгів, приведених на Фіг. 1 і 2.

[0017] Як ще один аспект наданого винаходу надається виділене гуманізоване антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент, які специфічно зв'язуються з епітопом, що містить амінокислотну послідовність DQGGYT (SEQ ID NO: 9). Антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент можуть містити CDR ділянок VH і VL з донорського антитіла. У деяких варіантах здійснення антитіло містить Fc-фрагмент, наприклад, Fc-фрагмент, одержаний з IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 або його варіанту. Fc-фрагмент може являти собою людський IgG4 або його варіант, наприклад, людський IgG4, що містить мутацію S241P, яка стабілізує шарнірну ділянку. Антитіло може містити константну ділянку легкого ланцюга людського каппа-ізоотопу або її варіанти. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло або фрагмент являє собою ScFv або Fab. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло або фрагмент являє собою гуманізоване антитіло або фрагмент або химерне антитіло або фрагмент. Антитіло або фрагмент можуть бути моноклональним антитілом. Антитіло або фрагмент можуть являти собою біспецифічне антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент, де одне плече антитіла або фрагмента специфічно зв'язується з епітопом, що містить амінокислотну послідовність DQGGYT (SEQ ID NO: 9). У деяких варіантах здійснення надається імунокон'югат, який містить одне з вказаних вище антитіл або фрагментів, зв'язаних з компонентом, який детектується або терапевтичний.

[0018] Як інший аспект надається виділене гуманізоване антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент, які специфічно зв'язуються з епітопом, що містить амінокислотну послідовність GYTMHQDQ (SEQ ID NO: 10). Антитіло або фрагмент можуть мати CDR ділянок VH і VL з донорського антитіла. У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент містять Fc-фрагмент, такий як Fc-фрагмент IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 або його варіант. Fcфрагмент може являти собою людський IgG4 і його варіанти, що містять мутацію S241P, яка стабілізує шарнірну ділянку. Антитіло може містити константну ділянку легкого ланцюга. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло або фрагмент являють собою ScFv або Fab. Надається біспецифічне антитіло або антигензв'язувальний фрагмент, де одне плече антитіла специфічно зв'язується з епітопом, що містить амінокислотну послідовність GYTMHQDQ (SEQ ID NO: 10). У деяких варіантах здійснення імунокон'югат, який містить будь-яке зі згаданих вище антитіл або фрагментів, зв'язаний з компонентом, який детектується або терапевтичний.

[0019] Як ще один аспект наданого винаходу надається спосіб профілактики або лікування таупатії у суб'єкта, що містить введення людині, яка потребує лікування таупатії, одного або більше антитіл або фрагментів, описаних у наданій заявці. Антитіла або антиген-зв'язувальний фрагмент вводять в умовах і у кількості, ефективній для профілактики або лікування таупатії. Таупатія може являти собою одне з наступного: хворобу Альцгеймера (ХА), прогресуючий над'ядерний параліч (ПНП), кортикобазальну дегенерацію (КБД), хворобу Піку (ХПі), групу

споріднених розладів під спільною назвою лобово-скронева деменція з паркінсонізмом, пов'язаним з хромосомою 17 (ЛСДП-17), аміотрофічний бічний склероз (АБС), хворобу Крейтцфельда-Якоба (ХКЯ), деменцію боксерів (ДБ), синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера (СГШШ), хвороба тілець Леві, хронічну травматичну енцефалопатію (ХТЕ) і хворобу Хантінгтона.

[0020] Надається спосіб лікування таупатії, що містить введення анти-тау антитіла або фрагмента суб'єктові, який потребує лікування, причому антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент специфічно зв'язуються з білком тау і містять варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH) і варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), причому кожна з ділянок VH і VL має послідовність, вибрану з амінокислотних послідовностей, приведених на фіг. 1 і 2, і антитіло або фрагмент вводять суб'єктові у дозі від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 250 мг/кг, альтернативно від приблизно 1 мг/кг до приблизно 25 мг/кг. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло або фрагмент мають ділянку VL, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1, 2, 3 і 4 [VK1, VK2, VK3 і VK4]; альтернативно або додатково, антитіло або фрагмент мають ділянку VH, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 5, 6, 7 і 8 [VH1, VH2, VH3 і VH4].

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

[0021] На фіг. 1 показані послідовності варіабельних ділянок мишиного антитіла HJ8.5, а також 4 послідовності гуманізованих варіантів для кожного з важких і легких ланцюгів

(4 послідовності VH і 4 послідовності VL/VK). На ФІГ. 1 показані послідовності MuVL (SEQ ID NO: 11); VK1 (SEQ ID NO: 1), VK2 (SEQ ID NO: 2), VK3 (SEQ ID NO: 3); VK4 (SEQ ID NO: 4); MuVH (SEQ ID NO: 12), VH1 (SEQ ID NO: 5); VH2 (SEQ ID NO: 6); VH3 (SEQ ID NO: 7); VH4 (SEQ ID NO: 8).

[0022] На Фіг. 2A показана послідовність з послідовностей гуманізованих варіабельної і константної ділянок важкого ланцюга VH1 (SEQ ID NO: 13). На Фіг. 2B показана послідовність з послідовностей гуманізованих варіабельної і константної ділянок важкого ланцюга VH2 (SEQ ID NO: 14). На Фіг. 2C показана послідовність з послідовностей гуманізованих варіабельної і константної ділянок важкого ланцюга VH3 (SEQ ID NO: 15). На Фіг. 2D показана послідовність варіабельної і константної ділянок важкого ланцюга VH4 (SEQ ID NO: 16). Варіабельна ділянка важкого ланцюга щеплена до константної ділянки важкого ланцюга людського IgG4, що містить мутацію S241P, яка стабілізує шарнірну ділянку. На Фіг. 2E показана послідовність з послідовностей гуманізованих варіабельної і константної ділянок важкого ланцюга VL1 (SEQ ID NO: 17). На Фіг. 2F показана послідовність з послідовностей варіабельної і константної ділянок важкого ланцюга VL2 (SEQ ID NO: 18). На Фіг. 2G показана послідовність з послідовностей варіабельної і константної ділянок важкого ланцюга VL3 (SEQ ID NO: 19). На Фіг. 2H показана послідовність з послідовностей варіабельної і константної ділянок важкого ланцюга VL4 (SEQ ID NO: 20).

[0023] На фіг. 3 приведені дані експресії, одержані з двох циклів транз'єнтної експресії клітин, трансфікованих полінуклеотидом, який кодує ділянки VH і VK. Результати підсумовані для 13 гуманізованих анти-тау антитіл, утворених на основі різних комбінацій гуманізованих варіабельних ділянок важких і легких ланцюгів, що мають різні спостережувані рівні експресії.

[0024] На фіг. 4 приведені дані аналізу активності у форматі ІФА (ELISA), виконаного для оцінювання здатності заявлених анти-тау антитіл конкурувати з початковим мишиним HJ8.5 (батьківським) антитілом за зв'язування з людським білком тау.

[0025] На фіг. 5 приведені результати аналізу методом поверхневого плазмонного резонансу (ППР), які визначають кінетику зв'язування шести кращих експресуючих гуманізованих конструкцій з людським тау.

[0026] На фіг. 6 показано зв'язування чотирьох варіантів гуманізованих антитіл з розчинним людським тау у сендвіч варіанті ІФА.

[0027] На фіг. 7A-7H показано зв'язування гуманізованих і контрольних антитіл у тканині, одержаної від мишей дикого типу (негативний тканинний контроль), мишей P301S (які експресують людський тау, що має мутацію P301S, і у яких розвивається асоційована з віком тау патологія), а також людей або з хворобою Альцгеймера, або прогресуючим над'ядерним паралічем (ПНП). Фіг. 7A. Зв'язування химери (позитивний контроль) у мишиній і людській тканині. Фіг. 7B. Зв'язування неспецифічного людського IgG4 (негативний контроль) у мишиній і людській тканині. Фіг. 7C. Зв'язування VH1/VK2 у мишиній і людській тканині. Фіг. 7D. Зв'язування VH1/VK3 у мишиній і людській тканині. Фіг. 7E.

Зв'язування VH2/VK2 у мишиній і людській тканині. Фіг. 7F.

Зв'язування VH2/VK3 у мишиній і людській тканині. Фіг. 7G. Зв'язування VH3/VK2 у мишиній і людській тканині. Фіг. 7H. Зв'язування VH3/VK3 у мишиній і людській тканині.

[0028] На фіг. 8 показано картування епітопа для мишиного HJ8.5 антитіла відносно амінокислотної послідовності людського тау. На Фіг. 8 показані послідовності тау людини, макака-резус та миші (SEQ ID NO: 21, 22, 23 відповідно).

[0029] На фіг. 9 у деталях показано картування епітопа у HJ8.5 і C₂N-8E12, що ґрунтується на пептидах. Картування свідчить про те, що епітоп зв'язування у C₂N-8E12 являє собою ₂sDQGGYT₃₀ (SEQ ID NO: 9) і відповідає епітопу мишиного батьківського HJ8.5. На Фіг. 9 показані послідовності пептидів PEP_2875800 – PEP_2875830 (SEQ ID NO: 24 – 54 відповідно).

[0030] На фіг. 10 показані результати зв'язування різних антитіл до людського тау або з людським тау, або з тау макака-резуса. Результати показують, що C₂N-8E12 і HJ8.5 не зв'язуються з тау макака-резуса, при цьому демонструють позитивне зв'язування з людським тау. HJ8.7 викликається як з людським тау, так і з тау макака-резуса.

[0031] На фіг. 11 показано зв'язування гуманізованого антитіла з тау у СМР (CSF), одержаної від хворих, що страждають на різні таупатії. Оцінювали зв'язування C₂N-8E12 з тау у зразках СМР, одержаних від пацієнтів з діагнозом різних таупатій.

ОПИС ВНАХОДУ

[0032] Є вагомі експериментальні свідчення і біологічні обґрунтування на користь стратегії, орієнтованої на тау імунотерапію як способу боротьби з тау патологією під час нейродегенерації. По-перше, у нормальному стані тау є добре розчинним, нативно розгорнутим, внутрішньоклітинним білком, так що антитіло, що знаходиться поза клітиною, навряд чи зможе вплинути на нормальні функції тау. По-друге, навантаження тау патології корелює з прогресуючою дисфункцією нейронів, втратою синапсів і зниженням функціональних можливостей організму у людини і у моделях таупатії у трансгенних мишей. По-третє, при патологічних станах тау стає неправильно згорнутим і утворює агрегати у вигляді внутрішньонейрональних нейрофібрилярних клубків (НФК), які складаються з патологічних тау-фібрил. Під час людських таупатій ця патологія прогресує від однієї ділянки мозку до іншої у специфічних для захворювання патернах. Експериментальні дані свідчать про те, що агрегати тау можуть поширюватися від клітини до клітини, індукуючи подальшу агрегацію тау і поширення тау патології у головному мозку. Ці дані показують, що агрегати, утворені в одній клітині, вивільняються у позаклітинний простір і можуть сприяти агрегації у сусідніх або зв'язаних клітинах. Нарешті, у рівні техніки показано, що анти-тау антитіла можуть запобігати або уповільнювати прогрес тау патології у мозку мишей, що несуть мутовану людську форму тау.

[0033] "Гуманізоване антитіло" являє собою антитіло або його варіант, похідну, аналог або фрагмент, який був модифікований з метою зменшення ризику появи імунної відповіді у людини на нелюдське антитіло після його введення. Гуманізоване антитіло, як використовується у наданій заявці, імуноспецифічно зв'язується з тим же або схожим епітопом, що і нелюдське антитіло (донорське антитіло). У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить каркасну (FR) ділянку, що має по суті амінокислотну послідовність людського антитіла, і визначальну комплементарність ділянку (CDR), яка має по суті амінокислотну послідовність нелюдського антитіла. Термін "по суті" у контексті CDR належить до CDR, що має амінокислотну послідовність щонайменше на 80 %, переважно щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентичну амінокислотній послідовності CDR нелюдського антитіла. Гуманізоване антитіло містить по суті всі з щонайменше одного, а звичайно два варіабельні домени (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv), в яких всі або по суті всі ділянки CDR відповідають ділянкам нелюдського імуноглобуліну (тобто донорського антитіла), і всі або по суті всі з каркасних ділянок є каркасними ділянками консенсусної послідовності людського імуноглобуліну. Переважно, гуманізоване антитіло також містить щонайменше частину константної ділянки (Fc) імуноглобуліну, як правило, людського імуноглобуліну. У наданому винаході надається гуманізоване антитіло, яке містить нову каркасну ділянку.

[0034] У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить як легкий ланцюг, так і щонайменше варіабельний домен важкого ланцюга. Антитіло також може включати ділянки CH1, шарнірну, CH2, CH3 і CH4 важкого ланцюга. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований легкий ланцюг. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований важкий ланцюг. У конкретних варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований варіабельний домен легкого ланцюга і/або гуманізований важкий ланцюг.

[0035] Антитіло може бути вибрано з будь-якого класу імуноглобулінів, включаючи 1gM, 1gG, 1gD, 1gA і 1gE, і будь-якого ізотипу, включаючи, без обмеження, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Гуманізоване антитіло може містити послідовності з більше ніж одного класу або ізотипу, а для

оптимізації бажаних ефекторних функцій можуть бути вибрані конкретні константні ділянки методами, добре відомими в даній галузі техніки.

[0036] Антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент вибирають з групи, яка складається з: зв'язаного дисульфідними зв'язками Fv, моноклонального антитіла, однокланцюгового варіабельного фрагмента (ScFv), химерного антитіла, CDRприщепленого антитіла, діатіла, гуманізованого антитіла, мультиспецифічного антитіла, Fab (антиген-зв'язувального фрагмента), біспецифічного антитіла, F(ab')₂ (двоплечового, антиген-зв'язувального фрагмента, як правило, одержуваного шляхом розщеплення антитіла пепсином), Fab" (результат розщеплення F(ab')₂ на два антиген-зв'язувальних фрагменти, як правило, за допомогою поділу у м'яких умовах), або Fv (антигензв'язувальний варіабельний фрагмент).

[0037] Термін "химерне антитіло" належить до антитіл, які містять послідовності варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів одного виду і послідовності константних ділянок іншого виду, наприклад, антитіла, які мають варіабельні ділянки мишиного важкого і легкого ланцюгів, зв'язані з людськими константними ділянками.

[0038] "Ділянка VH", "ділянка VL" або "ділянка VK" належить до варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH), варіабельної ділянки легкого лямбда-ланцюга (VL) або варіабельної ділянки легкого каппа-ланцюга (VK), відповідно. Ділянки VH і VL можуть бути додатково підрозділені на ділянки гіперваріабельності, які називаються визначальними комплементарність ділянками (CDR), які перемежаються більш консервативними ділянками, які називаються каркасними ділянками (FR). Кожна VH і VL складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих у наступному порядку від аміно-кінця до карбокси-кінця: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Імуноглобулінові молекули бувають різного типу (наприклад, 1gG,

1gE, 1gM, 1gD, 1gA і 1gY), класу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 1gA1 і 1gA2) або підкласу.

[0039] Термін "каркасна ділянка" або "послідовність каркасної ділянки" належить до інших послідовностей варіабельної ділянки мінус CDR. Оскільки точне визначення послідовності CDR може бути виконано у рамках різних систем, то зміст послідовності каркасної ділянки, залежить від відповідних різних способів інтерпретації. Шість CDR (CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 легкого ланцюга і CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 важкого ланцюга) також розділяють каркасні ділянки у легкому ланцюгу і важкому ланцюгу на чотири підділянки (FR1, FR2, FR3 і FR4) на кожному ланцюгу, причому CDR1 розташовується між FR1 і FR2, CDR2 між FR2 і FR3, а CDR3 між FR3 і FR4. Без позначення конкретних підділянок як FR1, FR2, FR3 або FR4, каркасна ділянка, згідно з іншими поглядами, являє собою об'єднані FR всередині варіабельної ділянки імуноглобулінового ланцюга, яка зустрічається одна у природі. "FR" являє собою одну з чотирьох підділянок, а "FRs" являє собою дві або більше з чотирьох підділянок, що складають каркасну ділянку.

[0040] Багато гуманізованих імуноглобулінів, які були описані раніше (Jones et al., Verhoeven et al., Riechmann et al.), містять каркасну ділянку, яка ідентична каркасній ділянці конкретного людського імуноглобулінового ланцюга, акцептор, і три CDR, одержані з нелюдського імуноглобулінового ланцюга. "Гуманізоване анти-тау" антитіло означає антитіло, яке утворене з нелюдського (донорського) антитіла, здатного зв'язуватися з тау, і це зв'язування переноситься на людське антитіло (акцептор).

[0041] Термін "CDR" належить до визначальної комплементарності ділянки всередині варіабельних послідовностей антитіла. У кожній з варіабельних ділянок важкого ланцюга і легкого ланцюга містяться три CDR, які для кожної з варіабельних ділянок позначаються як CDR1, CDR2 і CDR3. Амінокислотні послідовності цих CDR для ділянок VH і VL/K заявленого винаходу представлені на фіг. 1.

[0042] У даному описі термін однокланцюговий Fv, який називається також однокланцюгове антитіло, належить до рекомбінантних конструктам антитіла, одержаним шляхом виділення зв'язувальних доменів (як важкого, так і легкого ланцюгів) зв'язувального антитіла і забезпечення зшивального фрагмента, який дозволяє зберегти функцію зв'язування. Лінкерний пептид, який вставляється між двома ланцюгами забезпечує стабілізацію варіабельних доменів, не порушуючи правильне збирання і утворюючи активну зв'язувальну ділянку. Цей лінкер може бути довжиною від 5 до 30 амінокислот і звичайно складається з повторів амінокислотної послідовності (SEQ ID NO: 55) "GGGGS" ((Gly)₄Ser). По суті, утворюється радикально укорочене антитіло, яке має тільки варіабельний домен, необхідний для зв'язування антигену.

[0043] Діатіла, триатіла і тетратіла і варіанти більш високого порядку, як правило, створюють шляхом зміни довжини вказаного вище лінкерного пептиду від нуля до декількох амінокислот. Такі варіанти є полівалентними, мультиспецифічними антитілами, у яких домени VH і VL експресуються на поліпептидному ланцюгу з використанням лінкера, який є занадто коротким

для спаровування двох доменів на одному і тому ж ланцюгу, тим самим забезпечуючи спаровування доменів з комплементарними доменами іншого ланцюга з утворенням двох антиген-зв'язувальних ділянок (див., наприклад, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.

5 J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123). Такі зв'язувальні ділянки антитіл відомі у даній галузі (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York.

р. 790 (ISBN 3-540-41354-5)). Як альтернатива, у даній галузі також добре відомо, що полівалентні зв'язувальні варіанти антитіл можуть бути одержані з використанням ланок, що самозбираються, з'єднаних з варіабельним доменом.

10 [0044] Біспецифічні, триспецифічні або антитіла з множинною специфічністю створюються шляхом об'єднання важких і легких ланцюгів одного антитіла з важкими і легкими ланцюгами одного іншого або декількох інших антитіл. Ці ланцюги можуть бути ковалентно зв'язаними. Наприклад, термін "біспецифічне антитіло" належить до антитіла повної довжини, яке одержується методом квадрома (див. Milstein and Cuello (1983) Nature 305(5934):53740), шляхом хімічної кон'югації двох різних моноклональних антитіл (див. Staerz et al. (1985) Nature 314(6012): 628-31) або за допомогою підходу "виступ-у-западину" (knob-into-hole) або за допомогою аналогічних підходів, які дозволяють вносити мутацію у Fc-фрагмент (див. Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14):6444-6448), одержуючи множину різних видів імуноглобулінів, з яких тільки один є функціональним біспецифічним антитілом. З точки зору молекулярної функції, біспецифічне антитіло зв'язує один антиген (або епітоп) на одному з двох зв'язувальних плечей (одна пара HC/LC), а на іншому плечі (інша пара HC/LC) зв'язує інший антиген (або епітоп). Біспецифічне антитіло має два різних антигензв'язувальних плеча (в обох специфічностях і CDR послідовностях) і є моновалентним для кожного антигену, з яким воно зв'язується.

25 [0045] Декілька мишиних антитіл, здатних зв'язувати тау, одержували методами, відомими у даній галузі. Див. Holtzman et al., WO2014/08404. Далі, ці антитіла піддавали скринінгу для виявлення антитіл зі специфічною біологічною активністю, яка дозволяє розглядати їх як придатні кандидати для терапевтичного застосування.

30 [0046] У одному з аспектів наданий винахід надає композитні гуманізовані антитіла. Метод створення Композитного Людського Антитіла™ дозволяє одержувати гуманізовані антитіла шляхом ідентифікації потенційних Т-клітинних епітопів у послідовностях варіабельних ділянок (V ділянок) донорського антитіла і створення антитіла або антиген-зв'язувальних фрагментів таким чином, що зв'язування з потенційними Т-клітинними епітопами виключається (див. EP2, 388,871). На відміну від інших методів гуманізації, в яких як 'акцептори' легкого і важкого ланцюгів для відповідних визначальних комплементарності ділянок (CDR) з донорського антитіла (як правило, мишиного) використовується одна каркасна ділянка людської V ділянки легкого і важкого ланцюгів або каркасна ділянка людської консенсусної послідовності, Композитні Людські Антитіла™ містять множину сегментів послідовностей ("композити"), одержаних з V ділянок, які не є спорідненими до численних людських антитіл.

40 [0047] Сегменти послідовностей, одержані з бази даних, неспоріднених людських V ділянок вибирають після визначення амінокислот, які вважаються критичними для зв'язування антигену початковим антитілом. Всі вибрані сегменти послідовностей, одержані з бази даних людських V ділянок, фільтрують на наявність потенційних CD4+ Т-клітинних епітопів за допомогою засобів комп'ютерного моделювання, відомих у даній галузі техніки. Композитні Людські Антитіла™ зберігають афінність і специфічність краще, ніж стандартні гуманізовані антитіла, завдяки близькій відповідності сегментів людської послідовності всім секціям V ділянок початкового антитіла. Композитні Людські Антитіла™ збіднені Т-клітинними епітопами, і, отже, їх можна розглядати як гуманізовані і деімунізовані.

45 [0048] У одному з варіантів здійснення людські варіабельні ділянки у людському акцепторному 1gG замінюють мишиними варіабельними ділянками з донорського антитіла, одержуючи химерне антитіло.

50 [0049] У іншому варіанті здійснення CDR послідовності у людському акцепторному 1gG замінюють послідовностями мишиних CDR з донорського антитіла, одержуючи гуманізоване антитіло. Для видалення потенційних Т-клітинних епітопів і залишків у каркасних ділянках, які вважаються важливими для збереження зв'язувальних характеристик донорського антитіла, у гуманізоване антитіло вносять додаткові зміни. Фахівцю у даній галузі відомо, що для гуманізації антитіла можуть бути використані інші способи, такі як щеплення CDR.

55 [0050] У іншому варіанті здійснення гуманізують нелюдські антитіла, здатні зв'язуватися з людським тау.

60 [0051] Антитіла за даним винаходом можуть проявляти змінену афінність зв'язування і/або

змінену імуногенність у порівнянні з донорськими антитілами. У деяких варіантах здійснення химерні або гуманізовані антитіла мають по суті таку ж афінність зв'язування з тау епітопом, як донорське антитіло.

5 [0052] У іншому варіанті здійснення одноланцюговий варіабельний фрагмент, заснований на гуманізованому антитілі, описаному у наданій заявці, наприклад, гуманізованому анти-тау антитілі, може зв'язуватися у вигляді мономера.

[0053] У іншому варіанті здійснення, використовуючи фрагменти антитіла, може бути досягнене полівалентне зв'язування за допомогою діатіл, триатіл, тетратіл і інших варіантів більш високого порядку, які можуть бути одержані.

10 [0054] У іншому варіанті здійснення важкий і легкий ланцюги гуманізованого анти-тау антитіла можуть бути об'єднані з важким і легким ланцюгами інших антитіл з утворенням біспецифічних або інших додаткових мультиспецифічних антитіл.

[0055] Далі, гуманізовані антитіла за винаходом, наприклад, гуманізоване анти-тау антитіло також може бути у вигляді фрагмента антитіла, наприклад, Fab, мономера Fab', димера F(ab)'2 15 або повної молекули імуноглобуліну.

[0056] У одному варіанті здійснення наданий винахід надає виділений пептид, який складається з амінокислотної послідовності DQGGYT (SEQ ID NO: 9). Цей пептид являє собою коровий епітоп для описаних у даній заявці антитіл, таких як C₂N-8E12 або HJ8.5. У одному з аспектів наданого винаходу пептид включає X₍₀₋₈₎DQGGYTX₍₀₋₈₎ (SEQ ID NO: 56), де X являє 20 собою будь-яку амінокислоту. Попри те, що у ілюстративному прикладі показані 15 міри (див. Фіг. 11), фахівцю у даній галузі техніки буде очевидно, що наданий винахід включає пептиди різної довжини. Відповідно, заявлені антитіла або фрагменти можуть специфічно зв'язуватися з епітопом, який містить амінокислотну послідовність DQGGYT (SEQ ID NO: 9). Епітоп може бути лінійним або являти собою конформаційні епітопи і може містити від приблизно 6 до 22 25 амінокислот.

[0057] У інших варіантах здійснення заявлені способи належать до лікування таупатії за допомогою антитіла або антиген-зв'язувального фрагмента, де антитіло або фрагмент вводять у визначеній дозі суб'єкту з таупатією.

[0058] Придатні дози антитіла або антиген-зв'язувального фрагмента можуть бути виражені 30 у мг лікарського засобу на кг ваги тіла суб'єкта. Придатні дози антитіла або його антигензв'язувального фрагмента включають щонайменше приблизно 0,1 мг/кг, як альтернатива від приблизно 0,2 мг/кг, як альтернатива приблизно 0,25 мг/кг, як альтернатива приблизно 0,3 мг/кг, як альтернатива приблизно 0,5 мг/кг, як альтернатива приблизно 0,75 мг/кг, як альтернатива приблизно 1 мг/кг, як альтернатива приблизно 1,25 мг/кг, як альтернатива 35 приблизно 1,5 мг/кг, як альтернатива приблизно 2 мг/кг, як альтернатива приблизно 5 мг/кг, як альтернатива приблизно 7,5 мг/кг, як альтернатива приблизно 10 мг/кг, як альтернатива приблизно 12,5 мг/кг, як альтернатива приблизно 15 мг/кг, як альтернатива приблизно 20

мг/кг, як альтернатива приблизно 25 мг/кг, як альтернатива приблизно 30 мг/кг, як альтернатива приблизно 50 мг/кг, як альтернатива приблизно 100 мг/кг. Придатні дози антитіла 40 або його антиген-зв'язувального фрагмента можуть становити не більше ніж приблизно 250 мг/кг, як альтернатива не більше ніж приблизно 200 мг/кг, як альтернатива не більше ніж приблизно 175 мг/кг, як альтернатива не більше ніж приблизно 150 мг/кг, як альтернатива не більше ніж приблизно 125 мг/кг, як альтернатива не більше ніж приблизно 100 мг/кг, як альтернатива не більше ніж приблизно 75 мг/кг, як альтернатива не більше ніж приблизно 50 45 мг/кг, як альтернатива не більше ніж приблизно 25 мг/кг, як альтернатива не більше ніж приблизно 20 мг/кг, як альтернатива не більше ніж приблизно 15 мг/кг. Будь-які з вказаних вище мінімальних і максимальних значень можуть бути об'єднані для визначення діапазону (наприклад, від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 250 мг/кг) за умови, що мінімальне значення діапазону менше, ніж його максимальне значення.

50 [0059] Придатні дози антитіла або антиген-зв'язувального фрагмента можуть бути виражені у мг лікарського засобу, який вводиться суб'єкту. Придатні дози гуманізованого антитіла або антиген-зв'язувального фрагмента включають щонайменше приблизно 2,5 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 5 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 10 мг, як альтернатива 55 щонайменше приблизно 15 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 20 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 25 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 30 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 40 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 50 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 60 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 70 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 80 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 90 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 100 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 125 мг, як 60 альтернатива щонайменше приблизно 150 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 175 мг,

як альтернатива щонайменше приблизно 200 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 250 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 100 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 125 мг, як альтернатива щонайменше приблизно 300 мг. Придатні дози антитіла або антиген-зв'язувального фрагмента можуть становити не більше ніж приблизно 2500 мг, як альтернатива не більше ніж приблизно 2000 мг, як альтернатива не більше ніж приблизно 1500 мг, як альтернатива не більше ніж приблизно 1000 мг, як альтернатива не більше ніж приблизно 750 мг, як альтернатива не більше ніж приблизно 500 мг, як альтернатива не більше ніж приблизно 400 мг, як альтернатива не більше ніж приблизно 300 мг, як альтернатива не більше ніж приблизно 275 мг, як альтернатива не більше ніж приблизно 250 мг, як альтернатива не більше ніж приблизно 200 мг, як альтернатива не більше ніж приблизно 150 мг. Будь-які зі згаданих вище мінімальних і максимальних значень можуть бути об'єднані для визначення діапазону (наприклад, від приблизно 5 мг до приблизно 2500 мг) за умови, що мінімальне значення діапазону менше, ніж його максимальне значення.

[0060] C₂N-8E12 являє собою гуманізоване рекомбінантне IgG4 антитіло до людського тау. IgG4 остов у C₂N-8E12 містить мутацію S241P, яка стабілізує шарнірну ділянку, яка зводить до мінімуму утворення напів-антитіл. C₂N-8E12 зв'язується з амінокислотами 25-30 у людському тау (DQGGYT)(SEQ ID NO: 9), послідовність якого присутня у всіх сплайсингових варіантах людського тау, а також з амінокінцевими фрагментами тау. Антитіло зв'язується як з мономерним тау, так і агрегованим тау у тканині головного мозку людини, який страждає на таупатію. C₂N-8E12 є дуже стабільним з незначним ступенем агрегації або деградації. Загальні фізичні властивості C₂N-8E12 представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Молекулярна вага	145,72 кДа
Стереохімія	L-амінокислоти
Зовнішній вигляд	Прозора рідина від безбарвного до ясно-жовтого кольору
Розчинність	~130 мг/мл

[0061] Попри те, що винахід описаний з посиланням на приклади, що додаються, очевидно, що можливі різні модифікації і зміни у даному винаході без відходу від суті або обсягу наданого винаходу. Додатки до наданої заявки є ілюстративними прикладами даного винаходу і включені у надану заявку у всій своїй повноті як посилання.

Приклад 1

[0062] Цей приклад описує дії з гуманізації мишиного антитіла HJ8.5 і одержані результати. В результаті цих дій були одержані чотири гуманізовані варіабельні ділянки легкого ланцюга (VL або VK) і чотири гуманізовані варіабельні ділянки важкого ланцюга (VH).

[0063] Гуманізація, як правило, належить до методів зменшення імовірності потенційної імуногенності, пов'язаної з використанням нелюдського моноклонального антитіла для лікування хронічного захворювання. Два способи, що звичайно використовуються для зменшення імовірності імуногенності, являють собою щеплення CDR і деімунізацію. Мишине антитіло HJ8.5 деімунізували методом, розробленим компанією Antitope.

[0064] Щеплення CDR є одним з підходів у рамках білкової інженерії. Говорячи коротко, він заснований як на розумінні загальної архітектури антитіла, так і на її схожості у різних видів. Мишині і людські антитіла мають схожу спільну/консервативну архітектуру. Структурно антитіло підрозділяється на константні і варіабельні ділянки. Варіабельна ділянка може бути додатково розділена на так звані каркасні ділянки і ділянки CDR. Як можна бачити, варіабельна ділянка складається з чотирьох каркасних (Fwk) і трьох CDR ділянок. У варіабельних доменах легких і важких ланцюгів розташування каркасних і CDR ділянок однаково.

[0065] У разі щеплення CDR, нелюдські константні ділянки заміняють людськими константними ділянками, утворюючи так зване химерне антитіло. Крім того, мишині ділянки CDR переносять у людські каркасні ділянки; одержаний варіабельний домен являє собою суміш людських каркасних ділянок і мишиних CDR. Як останній етап, переносять декілька залишків з мишиних каркасних ділянок, які імовірно є важливими для збереження афінності (не показані).

[0066] Деімунізація: Метод Композитного Людського Антитіла™ компанії Antitope називається методом деімунізації, який використовується у поєднанні з ідентифікацією як CDR ділянок, так і ключових амінокислот у межах рамки зчитування, які імовірно впливають на

зв'язування. Одержані повністю гуманізовані антитіла зберігають афінність зв'язування і специфічність початкового моноклонального антитіла, і до того ж позбавлені CD4+Т-клітинних епітопів, що дозволяє уникати небажаної імуногенності у організмі людини.

[0067] Композитні Людські Антитіла™ утворюють шляхом об'єднання множини сегментів послідовностей людського антитіла, одержаних з Бази даних компанії Antitope, яка містить 100000 послідовностей варіабельних ділянок неспоріднених повністю людських антитіл. Початкове моделювання послідовностей варіабельних ділянок антитіла HJ8.5 використовується для визначення амінокислот, які є критичними для зв'язування антитіла і які потім використовуються для обмеження вибору сегментів людських послідовностей. Після цього аналізують окремі сегменти послідовностей і стики між сусідніми сегментами за допомогою двох запатентованих методів комп'ютерного моделювання (iTope™ і TCED™) для вибору послідовностей повністю людських варіабельних ділянок, які позбавлені CD4+ Т-клітинних епітопів. ДНК, кодує варіабельні ділянки для Композитних Людських Антитіл, синтезують, клонують у експресуючому векторі з людськими константними ділянками і трансфікують у клітини ссавця для одержання гуманізованих антитіл.

[0068] Гуманізація HJ8.5: Структурні моделі V ділянок антитіла-412 мишиного антитіла HJ8.5 одержували за допомогою швейцарського PDB і аналізували для визначення важливих "незамінних" амінокислот у V ділянках, які, імовірно, є суттєвими для збереження зв'язувальних властивостей антитіла. Аналіз виявив ряд незамінних залишків у каркасній ділянці як кандидати для включення у повністю гуманізовані V ділянки. Сегменти послідовностей людських варіабельних ділянок вибирали так, щоб вони включали один або більше з цих залишків.

[0069] Попередній набір сегментів людських послідовностей, які можуть бути використані для утворення повністю гуманізованих антитіл HJ8.5, вибирали і аналізували методом iTope™ для аналізу зв'язування пептидів з алелями людського МНС класу 11 методом комп'ютерного моделювання (Perry et al., 2008), а також за допомогою TCED™ (бази цих Т-клітинних епітопів) Т-клітинних епітопів відомих антитіл з аналогічними послідовностями (Bryson et al., 2010). Відкидали сегменти послідовностей, які були ідентифіковані як значущі нелюдські в'язучі гаметичного типу з людським МНС класу 11, або які мали значущі попадання відносно TCED™. Комбінації сегментів послідовностей також аналізували для гарантії того, що стики між сегментами не містять потенційні Тклітинні епітопи. Потім вибрані сегменти об'єднували, одержуючи послідовності V ділянок легкого і важкого ланцюгів для синтезу. Для HJ8.5 розробили і сконструювали чотири ланцюги VH і чотири ланцюги VK.

[0070] На фіг. 1 показані послідовності варіабельних ділянок мишиного антитіла HJ8.5, а також 4 послідовності гуманізованих варіантів для кожного з важких і легких ланцюгів (4 послідовності VH і 4 послідовності VL/VK). Амінокислотні послідовності цих чотирьох ланцюгів VH і чотирьох ланцюгів VK приведені на фіг. 1. Послідовності CDR, визначені по Кабату та ін., виділені червоним кольором (підкреслені). Зміни у каркасних ділянках у порівнянні з початковою мишиною послідовністю виділені синім кольором і жирним шрифтом.

[0071] У таблиці В-1 підсумовані дані про кількість змін у каркасних ділянках, введених у кожний варіант варіабельних доменів важкого і легкого ланцюгів.

Таблиця В-1

Варіабельний домен	Кількість замін у каркасній ділянці
VH1	4
VH2	5
VH3	10
VH4	11
VK1	6
VK2	7
VK3	11
VK4	12

[0072] На фіг. 2 показані послідовності гуманізованих варіабельної і константної ділянок для кожного з важких і легких ланцюгів (4 послідовності VH і 4 послідовності VL/VK). Варіабельну ділянку важкого ланцюга прищеплюють до константної ділянки важкого ланцюга людського

IgG4, що містить мутацію S241P, яка стабілізує шарнірну ділянку. Варіабельну ділянку легкого ланцюга прищеплюють до константної ділянки людського легкого каппа-ланцюга. У цій таблиці також приведені теоретично обчислена ізоелектрична точка (P1) і молекулярна вага (Mw, MW).

[0073] На фіг. 3 показані дані експресії, одержані з 2 циклів транзійної експресії клітин, трасфікованих полінуклеотидами, що кодують ділянки VH і VK. Результати по 13 гуманізованим анти-тау антитілам підсумовані. Різні комбінації важких і легких ланцюгів дають помітно різні рівні експресії. Що спостерігалися. У 1-му циклі всі варіанти ділянок VH і VL об'єднували один з одним (показані результати тільки для 13 з 16, протестованих). У другому циклі було протестовано 6 кращих експресуючих комбінацій, що спостерігалися в 1 циклі. Експресія показана в мкг антитіла, виміряна на 1 мл культурального середовища. Більш високі рівні експресії є переважними, оскільки це свідчить про те, що антитіло має правильне збирання, секретується, як і очікувалося, є нетоксичним і в цілому стабільним.

[0074] На фіг. 4 наведені дані з аналізу активності. Для одержання додаткової характеристики гуманізованих варіантів анти-тау антитіла, за допомогою аналізу активності оцінювали здатність антитіл конкурувати з початковим мишиним HJ8.5 (батьківським антитілом) за зв'язування з людським тау у форматі методу ІФА. Формат аналіз включає покриття пластини ELISA людським тау, після чого забезпечують можливість тестованому антитілу, а також біотинильованому HJ8.5, конкурувати за зв'язування з тау. Аналіз дозволяє вимірювати відносну величину IC50 для кожного гуманізованого варіанту антитіла. Значення IC50 нормують відносно значення для химерного HJ8.5 для порівняння результатів, одержаних для різних пластин. Ці дані показують, що процес гуманізації не привів до значних змін у здатності гуманізованих антитіл зв'язувати людський тау.

Приклад 2

[0075] У цьому дослідженні описано використання Biacore T200 для вимірювання і порівняння характеристик зв'язування під час взаємодії шести повністю гуманізованих (VH1/VK2, VH1/VK3, VH2/VK2, VH2/VK3, VH3/VK2 і VH3/VK3, описаних вище у прикладі 1) моноклональних антитіл і одного химерного моноклонального антитіла, одержаного на основі HJ8.5, з рекомбінантним людським білком тау-412. Мета даного дослідження полягала у використанні приладу Biacore T200 на ефекті поверхневого плазмонного резонансу для визначення з високим розрізненням кінетичних характеристик взаємодії між тау-412 і сім'ю вказаними mAb.

[0076] Антитіла зберігали при температурі 4°C. Тау-412 зберігали при -20°C згідно з інструкцією виробника. Після відновлення, розчин тау-412 зберігали на льоду і використовували впродовж 24 годин. Аліквоти відновленого тау-412 заморожували впродовж 30 хвилин після відновлення і зберігали при -20°C.

[0077] Під час роботи приладу Biacore використовували програмне забезпечення Biacore T200 evaluation software v1.0 (Uppsala, Sweden). Усі матеріали купували у компанії Biacore, якщо не вказане інше:

Набір 2 для профілактичного обслуговування Biacore	BR-1006-51
Сенсорні чіпи S серії CM5	BR-1006-68
Набір для зв'язування амінів	BR-1000-50
10 mM ацетатний буфер, pH 4.5	BR-1003-51
HBS-EP робочий буфер	BR-1006-69
10 mM буфер гліцин-HCl, pH 1,5	BR-1003-54
10 mM буфер гліцин-HCl, pH 2,0	BR-1003-55
Білок A (Sigma)	P6031
4M MgCl ₂ гексатригидрат (Sigma)	M9272-500G

[0078] Всі експерименти розробляли за допомогою експертного програмного забезпечення Biacore. Використовували наступні методи компанії Biacore: іммобілізація; кінетика/афінність; і десорбція і очищення.

[0079] Перед прогоном будь-яких зразків, а також в ході дослідження, проводили перевірку системи (Набір 2 для профілактичного обслуговування Biacore). Всі системи тестували (насос для реагентів, рефрактометр, ін'єкції, селектори шуму, мікшування і буфери) для забезпечення гарантії того, що прилад функціонує згідно з критеріями, встановленими виробником.

[0080] Після встановлення чіпу CM5/білок A запускали систему і потім нормували, використовуючи нормалізуючий розчин BIA (Набір 2 для профілактичного обслуговування Biacore). Всі зразки проганяли при 25°C, при цьому штатив зі зразками тримали у інкубаторі при

5°C. Чіп додавали у систему з HBS-EP, що використовується як робочий буфер.

[0081] Зразки mAb зберігали у тому вигляді, як вони були одержані і розбавляли до 100 нМ для всіх прогонів у методі іммобілізації (захоплення). Антиген тау-412 відновлювали з сухого порошку, використовуючи воду Milli-Q, до кінцевої концентрації 1 мг/мл; у прогонах для визначення кінетичних характеристик використовували додаткові розведення. Масу і молекулярну вагу тау-412, використовуюваного під час розрахунку концентрації, одержували від виробника реагенту (100 мкг/флакон і 42,9 кДа). Білок-носії до цього розчину не додавався. Флакони з антигеном відновлювали тільки за необхідністю і до моменту їх використання зберігали у вигляді порошку при температурі -20°C. Після відновлення, розчин антигену тримали на льоду не більше 24 годин.

[0082] Для цього дослідження був вибраний аналіз захоплення білком А. Ефективність поверхні з білком А перевершувала як таку поверхню з анти-людським білком А/G, білком G і білком L, які також були протестовані. Чіп з білком А готували шляхом іммобілізації, використовуючи стандартну хімічну реакцію зв'язування аміну. Іммобілізацію виконували при концентрації білка 5 мкг/мл у 10 мМ ацетатному буфері (pH 4,5) до одержання цільової відповіді величиною 500 RU на сенсорному чіпі S серії CM5 (Biacore).

[0083] Остаточні рівні відповіді для всіх чіпів з білком А, позначені F_{cS} показані в таблиці G-1.

Таблиця G-1

Ліганд		Кінцевий рівень відповіді (RU)
F_{c1}	Білок А	697,1
F_{c2}	Білок А	691,4
F_{c3}	Білок А	708,3
F_{c4}	Білок А	704,6

[0084] Для кінетичних експериментів, кількість іммобілізованого/захопленого ліганду має бути обмеженою, щоб уникнути ефектів масопереносу на поверхні чіпу. Для кінетичних експериментів поверхня в ідеалі повинна мати максимальний рівень зв'язування аналіту (R_{max}), який дорівнює 50-100 RU. Таким чином, кількість ліганду для іммобілізації розраховують рівнянням 1:

аналіт – зв'язувальна здатність

$$= \frac{MW \text{ аналіту}}{MW \text{ ліганду}} \cdot \text{іммобілізований ліганд (MU)} \cdot S_m$$

[0085] Приймаючи середній MW для аналіту тау-412, що дорівнює 42,9 кДа (одержано від виробника реагентів), для ліганду, що дорівнює 150 кДа (розраховане значення для антитіл) (mAb), R_{max} , що дорівнює 100 RU, і стехіометрію (S_m), що дорівнює 1, для захоплення всіх тестованих антитіл встановлювали цільове значення, що дорівнює 300 RU. Рівні захоплення, одержані у дослідженні, варіювали від ~280 до 400 RU. Для другого і третього прогонів регулювали кількість антитіла, яке ін'єктується, щоб наблизитися до бажаного рівня захоплення, 300 RU.

[0086] Неспецифічне зв'язування (НСЗ) може бути обумовлене або аналітом, або домішками у аналіті, що вступають у взаємодію або з лігандом (неспецифічне і таке, що важко виявляється), білком захоплення, або з поверхнею сенсорного чіпу. При аналізі відповіді на порожній поверхні F_{c1} після 300 секундної ін'єкції відносно високої концентрації (40 нМ) тау-412, НСЗ не спостерігалось ні з карбоксидекстрановою поверхнею, ні з поверхнею з білком захоплення А. При концентрації тау-412 >100 нМ спостерігали значуще НСЗ з карбоксидекстрановою поверхнею чіпу; проте для подальшого кінетичного аналізу концентрації у межах цього діапазону не були затребувані.

[0087] Здійснювали визначення умов відновлення, при цьому оптимальні умови для

відновлення химерних і VH1/VK2 антитіл на поверхні з білком А виявилися наступними: три ін'єкції по 240 секунд 10 мМ гліцин-HCl буфера (pH 1,7) з подальшою одиничною 300-секундною ін'єкцією 4М MgCl₂, всі, що вводяться зі швидкістю 40 мкл/хв. Після останньої ін'єкції для відновлення слідував етап 600 секундного очікування для стабілізації поверхні перед початком наступного циклу зв'язування.

[0088] Пошук буфера не проводився, оскільки початкові тести показали, що вибраний буфер 'HBS-EP' забезпечував відтворену систему, придатну для кінетичного аналізу.

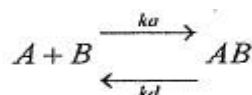
[0089] Ефективність поверхні аналізували за допомогою повторних контрольних ін'єкцій 2,5 нМ тау-412 на початку, в середині і у кінці кінетичного прогону. Стабільне зв'язування спостерігали впродовж всього кінетичного прогону, приділяючи особливу увагу питанню придатності системи для кінетичного аналізу.

[0090] Обмеження масопереносу відбувається за наявності важливого компонента, який асоціюється зі швидкістю перенесення аналіту на поверхню і з поверхні чіпу. Там, де масоперенос є значним, результати кінетичного аналізу можуть бути неточними. Зниження густини іммобілізованого ліганду або збільшення швидкості потоку може знизити обмеження масопереносу. Для даного дослідження була вибрана швидкість потоку, яка дорівнює 40 мкл/хв, виходячи з попереднього досвіду використання поверхонь з низькою густиною і антигенів зі схожими значеннями Mw.

[0091] Контрольний експеримент по реакції зв'язування використовували для оцінювання взаємодії ліганд-аналіт для перевірки на наявність відхилень від моделі зв'язування 1-к-1. Аналіт ін'єктували на поверхню впродовж різних періодів часу (часу контакту), і аналізували швидкість дисоціації для визначення, чи змінюється вона залежно від часу контакту. Якщо така залежність спостерігається, це вказує на наявність другої події взаємодії після первинної події зв'язування, яка призводить до стабілізації комплексу на поверхні.

[0092] Виходячи з попереднього експерименту, в якому використовувалися формати для аналізу захоплення, спостережуваної стехіометрії зв'язування, що дорівнює 1,5, і того факту, що модель 1-к-1 могла б з визначеною долею достовірності відповідати кінетичним даним, контроль реакцій зв'язування не проводили, у зв'язку з відсутністю додаткового доказу на підтримку більш складних кінетичних взаємодій.

[0093] Модель зв'язування 1-к-1 використовували для апроксимації одержаних кінетичних даних (рівняння 2). Через відмінності у кількості захопленого антитіла, параметр R_{max} встановлювали локально, на відміну від глобального аналізу, для кожного кінетичного аналізу зв'язування антитіла.



[0094] Характеристика антитіла: Одержані характеристики і контрольні експерименти, проведені для вивчення поверхні з білком захоплення А підтвердили, що вона є придатною системою для визначення кінетичних значень взаємодій з тау-412. Стехіометрію зв'язування оцінювали за допомогою ін'єкції насиченого розчину тау-412 (1000 нМ) при 277 RU для захопленого VH1/VK2 на досліджуваній поверхні з білком А. Дві послідовні ін'єкції 1000 нМ тау-412, судячи з усього, забезпечували у результаті насичене зв'язування при 122 RU. Це дало 150 % стехіометрію зв'язування, що перевищує очікувану для зв'язування однієї молекули антитіла з однією молекулою тау-412. Причини цього можуть полягати у зв'язуванні антитіла з двома молекулами тау-412 або у олігомеризації тау-412 на поверхні чіпу.

[0095] Кінетичні дані одержували при швидкості потоку 40 мкл/хв для мінімізації будь-яких потенційних ефектів масопереносу. У кінетичному прогоні було запрограмовано по два повтори холостої проби (без антигену) і аналіта з концентрацією 2,5 нМ для перевірки стабільності як поверхні, так і аналіту під час кінетичних циклів. Для початкових кінетичних прогонів, виконували 2-кратні розведення тау-412 в межах від 40 нМ до 0,156 нМ. Для кінетичного аналізу і подальших прогонів вибирали діапазон концентрацій аналіту від 20 нМ до 0,625 нМ. Цей діапазон покривав множину концентрацій аналіту вище і нижче зареєстрованого K_D.

[0096] Фазу асоціації контролювали впродовж 500 секунд, щоб забезпечити можливість досягнення стійкого стану аналіту при деяких більш високих концентраціях. Для одержання достатнього зниження сигналу (>10 %) під час фази дисоціації кінетичного циклу, дисоціацію виміряли впродовж 1200 секунд. Як вже обговорювалося у розділі 5, після кожної стадії відновлення, забезпечували можливість для стабілізації F_cs впродовж 600 секунд. Сигнал з контрольного каналу F_c1 віднімали з сигналів з F_c2, F_c3 і F_c4.

- [0097] Кінетичні параметри для взаємодії тау-412 з сім'ю mAb, виміряні з використанням системи з білком захоплення А на Віасоре Т200, приведені у Таблиці F-2. Для коригування відмінностей у рівні захоплення антитіла між кожним циклом зв'язування, використовували локальний параметр R_{\max} у моделі зв'язування 1-к-1. Кінетичний аналіз виконували у трьох незалежних прогонах, використовуючи свіжі препарати тау-412 і антитіла. У прогоні 1 і прогонах 2+3 використовували різні флакони антигену тау-412; тому зареєстровані помилки, що асоціюються з середньою відповіддю, імовірно, пов'язані зі змінами при приготуванні аналіту і відмінностями у налаштуваннях аналізу і прогону. Від прогону 1 до прогонів 2+3, підбирали кількість антитіла, що ін'єктується, так, щоб наблизитися до цільових рівнів захоплення, 300 RU. Для прогону 1 химерне антитіло проганяли три рази, і аналіз всіх трьох наборів даних показаний у таблиці F-2. % CV для K_D , одержаного з цих трьох наборів даних, становив 4,3 %, вказуючи на те, що результати знаходяться в межах варіативності аналізу, що розглядається.

Таблиця F-2

Ліганд	Чіп	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	χ^2	Апенд икс 11
VH1/VK2	A11 /1	$2,80 \times 10^5$	$4,40 \times 10^2$	$6,11 \times 10^{-4}$	$2,80 \times 10^{-7}$	2,18		1,28	A3-4
VH1/VK2	A11 /3	$3,25 \times 10^5$	$1,00 \times 10^2$	$6,32 \times 10^{-4}$	$8,20 \times 10^{-7}$	1,95		0,44	A5-6
		$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$ (nM)		
Середнє значення		$3,02 \times 10^5$	$3,19 \times 10^4$	$6,21 \times 10^{-4}$	$1,48 \times 10^{-5}$	2,06	0,17		
Ліганд	Чіп	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	χ^2	Апенд икс 11
VH1/VK3	A11 /1	$2,80 \times 10^5$	$9,10 \times 10^2$	$6,26 \times 10^{-4}$	$8,50 \times 10^{-7}$	2,24		0,99	A7-8
VH1/VK3	A11 /2	$2,95 \times 10^5$	$4,40 \times 10^2$	$5,72 \times 10^{-4}$	$2,70 \times 10^{-7}$	1,94		0,52	A9-10
		$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$ (nM)		
Середнє значення		$2,87 \times 10^5$	$1,07 \times 10^4$	$5,99 \times 10^{-4}$	$3,76 \times 10^{-5}$	2,09	0,21		
Ліганд	Чіп	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	χ^2	Апенд икс 11
VH2/VK2	A11 /1	$2,62 \times 10^5$	$4,30 \times 10^2$	$6,28 \times 10^{-4}$	$2,80 \times 10^{-7}$	2,40		0,83	A11- 12
VH2/VK2	A11 /2	$2,84 \times 10^5$	$4,10 \times 10^2$	$5,87 \times 10^{-4}$	$2,60 \times 10^{-7}$	2,06		0,70	A13- 14
		$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$ (nM)		
Середнє значення		$2,73 \times 10^5$	$1,59 \times 10^4$	$6,08 \times 10^{-4}$	$2,94 \times 10^{-5}$	2,23	0,24		
Ліганд	Чіп	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	χ^2	Апенд икс 11
VH2/VK3	A11 /1	$2,68 \times 10^5$	$8,80 \times 10^2$	$6,53 \times 10^{-4}$	$9,00 \times 10^{-7}$	2,44		1,11	A15- 16
VH2/VK3	A11 /2	$2,92 \times 10^5$	$4,40 \times 10^2$	$5,33 \times 10^{-4}$	$2,60 \times 10^{-7}$	1,83		0,50	A17- 18
		$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$ (nM)		
Середнє значення		$2,80 \times 10^5$	$1,71 \times 10^4$	$5,93 \times 10^{-4}$	$8,44 \times 10^{-5}$	2,13	0,43		
Ліганд	Чіп	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	χ^2	Апенд икс 11
VH3/VK2	A11 /1	$2,62 \times 10^5$	$3,20 \times 10^2$	$5,46 \times 10^{-4}$	$2,20 \times 10^{-7}$	2,08		0,45	A19- 20
VH3/VK2	A11	$2,90 \times 10^5$	$3,70 \times 10^2$	$4,85 \times 10^{-4}$	$2,20 \times 10^{-7}$	1,67		0,71	A21-

	/2								22
		$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$ (nM)		
Середнє значення		$2,76 \times 10^5$	$1,99 \times 10^4$	$5,15 \times 10^{-4}$	$4,28 \times 10^{-5}$	1,88	0,29		
Ліганд	Чіп	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	χ^2	Апенд икс 11
VH3/VK3	A11 /1	$2,54 \times 10^5$	$3,10 \times 10^2$	$5,59 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-7}$	2,20		0,80	A23- 24
VH3/VK3	A11 /2	$2,76 \times 10^5$	$3,80 \times 10^2$	$4,54 \times 10^{-4}$	$2,20 \times 10^{-7}$	1,65		0,80	A25- 26
		$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$ (nM)		
Середнє значення		$2,65 \times 10^5$	$1,56 \times 10^4$	$5,07 \times 10^{-4}$	$7,40 \times 10^{-5}$	1,92	0,39		
Ліганд	Чіп	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	χ^2	Апенд икс 11
Химерне	A11 /1	$7,18 \times 10^5$	$1,60 \times 10^3$	$1,60 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-6}$	2,23		1,17	A27- 29
Химерне	A11 /2	$7,22 \times 10^5$	$3,00 \times 10^3$	$1,30 \times 10^{-3}$	$3,50 \times 10^{-6}$	1,79		0,97	A30- 31
Химерне	A11 /3	$7,23 \times 10^5$	$2,60 \times 10^3$	$1,40 \times 10^{-3}$	$3,30 \times 10^{-6}$	1,94		0,49	A32- 33
		$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$ (nM)		
Середнє значення		$7,21 \times 10^5$	$2,87 \times 10^3$	$1,43 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-4}$	1,99	0,22		

[0098] Значення χ^2 показують, наскільки добре дані асоціації і дисоціації відповідають запропонованій моделі зв'язування 1-к-1: чим нижче значення, тим краща відповідність. Асоційоване значення SE для констант швидкостей зображують невизначеність, пов'язану з підгонкою даних до описаної моделі і не відображають загальну невизначеність для істинних кінетичних значень. Дані по середній відповіді являють собою середні кінетичні значення і асоційовані SD для 2 або 3 незалежних аналізів.

[0099] Згідно з середніми значеннями KD, приведеними у таблиці F-2, антитіла можуть бути ранжировані за афінністю таким чином: VH3/VK2>VH3/VK3>химерне>VH2/VK3>VH1/VK3>VH1/VK2>VH2/VK2. % CV асоційований з середніми кінетичними параметрами у діапазоні від 10-20 %, і, таким чином, цілком імовірно, що всі антитіла мають практично однакову афінність, і що відмінності є виключно результатом похибки аналізу. В цілому, відмінності у зв'язуванні між антитілами можуть бути пов'язані з похибкою аналізу, і передбачається, що значення KD гуманізованих антитіл не відрізняються значущо від таких для химерного антитіла.

[00100] Показані порівняння кінетичних значень, визначених за допомогою аналізу захоплення білком А на Biorad T200 для взаємодії цих антитіл з тау-412,. Виявилось, що химерне антитіло має профіль зв'язування, який значущо відрізняється від профілю гуманізованих антитіл, незважаючи на їх схожість за афінністю. Графік залежності k_d від k_a , показує відносні кінетичні значення взаємодії тестованих антитіл з тау-412, визначені за допомогою аналізу захоплення білком А на Biorad T200. Пунктирні діагоналі представляють лінії ізоафінності. Слід зазначити, що осі відображають різні діапазони даних з метою покращення чіткості відображення гуманізованих антитіл на графіку.

[0101] На фіг. 5 приведені результати аналізу методом поверхневого плазмонного резонансу (ППР), який визначає кінетику зв'язування шести кращих експресуючих гуманізованих конструкцій з людським білком тау. Тестоване антитіло іммобілізують на чіпі ППР, і потім чіп омивають потоком людського тау з різними концентраціями. Для кожного з варіантів обчислюють швидкості асоціації і дисоціації, а також афінність на підставі вимірюваних подій зв'язування. Химерний варіант теж тестували.

Приклад 3

[0102] На фіг. 6 показано зв'язування чотирьох варіантів гуманізованих антитіл з розчинним людським тау у сендвіч варіанті ІФА. Методи аналізу, які засновані на пасивній адсорбції, можуть потенційно привести до недостовірних результатів зв'язування. Для визначення вказаної проблеми був використаний метод, заснований на застосуванні розчинів для

вимірювання активності зв'язування варіантів гуманізованих антитіл. У форматі цього аналізу антиген (людський тау) захоплюється моноклональним антитілом до людського тау, який розпізнає епітоп, відмінний від епітопа, що розпізнається HJ8.5. Подальше зв'язування гуманізованих анти-тау антитіл з захопленим людським тау залежить від концентрації антигену, тоді як контролі IgG4 ізотопів взагалі не показують зв'язування. Цей аналіз показує, що зв'язування гуманізованих анти-тау антитіл з людським тау специфічний, і що антитіла зв'язуються з розчинним людським тау.

Приклад 4

[0103] На фіг. 7 (A-7H показано зв'язування гуманізованих і контрольних антитіл у тканинах мишей дикого типу (негативний тканинний контроль), мишей P301S (які експресують людський тау, що має мутацію P301S, і у яких розвивається асоційована з віком тау патологія), а також людей або з хворобою Альцгеймера, або з Прогресуючим над'ядерним паралічем (ПНП). Метою даного дослідження було підтвердження збереження здатності гуманізованих антитіл зв'язуватися з агрегованим тау у тканині у порівнянні з химерною формою HJ8.5. На знімках приведених репрезентативні зображення фарбування мишиного і людського мозку з різними варіантами гуманізованого антитіла HJ8.5. Тестували мишей P301S у віці 4 і 9 місяців, і обидві часові точки показують наявність патологічних агрегатів тау, причому 9 місячні миші мають більше патологій тау, ніж 4-місячні миші. У разі забарвлювання людського мозку, вивчали зразок тканини мозку, одержаний від одного пацієнта з ПНП, і зразок тканини мозку, одержаний від одного пацієнта з ХА. На ФІГ. 7A показано забарвлювання химерного HJ8.5 для мишиної тканини і людської тканини з ХА. На ФІГ. 7B показано забарвлювання для антитіла негативного контролю (неспецифічний людський IgG4). На ФІГ. 7C – 7H показано забарвлювання для шести гуманізованих антитіл. Всі гуманізовані варіанти мишиного антитіла HJ8.5 зв'язуються з агрегатами тау, виявленими у головному мозку мишей P301S, а також агрегатами тау, виявленими у тканинах головного мозку пацієнтів з діагнозом або ХА, або ПНП.

Приклад 5

[0104] На фіг. 8 показані епітопи HJ8.5 у людському тау. Епітоп картован за допомогою дріжджового дисплея. Для здійснення цього методу, використовуючи дріжджі, експресували різні пептиди, які охоплюють послідовність людського тау. Зв'язування антитіла HJ8.5 у дріжджах виміряли у культурі методом імунофлуоресценції. Спостерігали зв'язування у дріжджах, що експресують варіанти тау, які включали перші 34 амінокислоти, при цьому зв'язування було відсутнє, якщо дріжджі експресували тільки перші 32 амінокислоти тау. Це служить підтвердженням того, що епітоп знаходиться у межах перших 34 амінокислот. Окрім цього, HJ8.5 зв'язується якщо пептид включає амінокислоти 27-135, але зв'язування відсутнє, якщо пептид охоплює амінокислоти 30-135. Це служить підтвердженням того, що епітоп включає амінокислоти, наступні за амінокислотою 27. Виходячи з цих даних, епітоп міститься у межах послідовності 2734 людського тау (GYTMHQDQ)(SEQ ID NO: 10). На Фіг. 8 також показані послідовності тау макака-резуса і миші, і червоним кольором відмічені амінокислотні зміни відносно людського тау.

[0105] На фіг. 9 більш детально показано засноване на пептидах картування епітопа у HJ8.5 і C₂N-8E2. Утворювали бібліотеку лінійних пептидів довжиною 15 амінокислот, що охоплюють всю послідовність людського тау (1N4R, 412 амінокислоти). Додатково також продукували подвійні аланінові варіанти цих пептидів, у яких амінокислоти 10 і 11 замінювали аланіном. Для бібліотеки подвійних аланінових пептидів, будьякі, що зустрічаються у природі аланіни у положенні 10 або 11 замінювали на гліцин. Всі пептиди наносили на пептидну матрицю, потім вносили зразки HJ8.5 або C₂N-8E12, і виміряли зв'язування. Епітоп(и) зв'язування тау обох антитіл були достовірно картовані за допомогою цих пептидних матриць. Епітоп зв'язування для C₂N8E12 являє собою ²⁵DQGGYT₃₀ (SEQ ID NO: 9) і співпадає з епітопом мишиного батьківського HJ8.5. Зв'язування HJ8.5 і C₂N-8E12 з пептидами тау сильно зменшується, коли амінокислоти D, Q, Y або T у епітопі замінені аланіном, що говорить про їх ключову роль у зв'язуванні антитіла. Проте, коли два центральні гліцини у епітопі були замінені аланіном, зв'язування антитіл з пептидами тау не зменшилося істотним чином (PER 2875811). Імовірно, цей факт не свідчить про те, що ці амінокислоти не є важливими для зв'язування, швидше це пов'язано з консервативною природою заміщень між аланіном і гліцином. Епітоп картували, використовуючи ці детально описані методи, які трохи відрізняються від картування за допомогою дріжджового дисплея (фіг. 8A). Ця відмінність пов'язана з відмінністю у аналізах зв'язування: у системі дріжджового дисплея використовуються пептиди більшого розміру. Метод використання матриці пептидів довжиною 15 амінокислот за своїми результатами перевершує метод дріжджового дисплея.

Приклад 6

[0106] На фіг. 10 показані результати зв'язування різних антитіл до людського тау або з людським тау, або з тау макака-резуса. Тестували мишині антитіла HJ8.5 і HJ8.7 до людського тау, нарівні з гуманізованим варіантом VH1/VK2 (також згадуваним як C₂N-8E12). На Фіг. 8 показано, що заявлена послідовність епітопа зв'язування GYTM(H/L)QDQ (SEQ ID NO: 57) відрізняється у людського тау і тау макака-резуса однією амінокислотою у положенні 32. На Фіг. 8 показано, що заявлена послідовність епітопа зв'язування DQ(G/E)GYT (SEQ ID NO: 58) відрізняється у людського тау і тау макака-резуса однією амінокислотою у положенні 27. Для визначення, чи впливають ці відмінності у амінокислотах між двома видами тау на зв'язувальну здатність антитіл HJ8.5/C₂N-8E12, проводили наступний експеримент. Зв'язування C₂N-8E12, HJ8.5 (мишиний попередник C₂N-8E12) і HJ8.7 (мишине антитіло до людського тау, яке зв'язується з епітопом тау, в якому амінокислотна послідовність людини і макака-резуса ідентичні на 100 %) виміряли для людського тау і тау макака-резуса шляхом нанесення на 96 лункові планшети ELISA або людського тау, або тау макака-резуса при різних концентраціях. Результати показали, що C₂N-8E12 і HJ8.5 не зв'язуються з тау макака-резуса, але показують позитивне зв'язування з людським тау. Як очікувалося, HJ8.7 зв'язується як з людським тау, так і з тау макака-резуса.

Приклад 7

[0107] На фіг. 11 показано зв'язування гуманізованого антитіла з тау у СМР, одержаної від людей з різними таупатіями. Оцінювали зв'язування C₂N-8E12 з тау у зразках СМР, одержаних від пацієнтів з діагнозом різних таупатій, а також від пацієнтів того ж віку і молодих/здорових пацієнтів, використаних як контроль. Для демонстрації зв'язування C₂N-8E12 з тау у людській СМР, одержаної від пацієнтів з ХА, КБД, ЛСД або ПНП, а також від суб'єктів такого ж віку і молодих/дорослих суб'єктів, використаних як контроль, застосовували метод сендвіч-ІФА. C₂N-8E12 використовували як антитіла покриття для захоплення тау у зразках СМР. Біотинильовані мишині моноклональні антитіла HJ8.7 до тау використовували як антитіла-маркери. Лунки покривали контрольним людським IgG4, що виконує у експерименті роль негативного контролю. Спостережувані сигнали з лунок з C₂N-8E12 сильно відрізнялися від сигналів з лунок, покритих контрольним IgG4, що говорить про специфічне зв'язування C₂N-8E12 з тау у зразках людського СМР. Використовуючи стандартну криву (рекомбінантний тау), можна одержати кількісну інформацію про концентрацію тау у цих зразках СМР.

Приклад 8

[0108] Це дослідження являє собою рандомізоване, подвійне сліпе дослідження фази 1 з використанням плацебо як контроль і одноразової зростаючої дози (SAD), призначене для проведення у десяти (10) центрах. Воно розроблено для оцінювання безпеки, переносимості, імуногенності і фармакокінетики (ФК) введення одноразової дози C₂N-8E12, а також для визначення МПД для використання у майбутніх повторних дослідженнях.

[0109] Основна мета даного дослідження полягає у визначенні безпеки, переносимості, імуногенності і максимальної переносимої дози (МПД) одноразової дози C₂N-8E12 для суб'єктів з ПНП. Оцінювання безпеки включає фізичне і неврологічне обстеження, лабораторні дослідження по клінічній безпеці і у аналізі імуногенності, побічних ефектів, життєво важливих ознак і супутніх лікарських препаратів.

[0110] Другорядною метою є визначення: системних фармакокінетичних параметрів при прийомі одноразової дози, які включають: максимальну концентрацію у плазмі після одиної інфузії; площа під кривою (AUC) після одиної інфузії; час досягнення максимальної концентрації після інфузії; період напіввиведення C₂N-8E12 у кінцевій фазі; розподіл C₂N-8E12 у спинномозковій рідині (СМР); і взаємодія з біологічною мішенню шляхом вимірювання рівнів розчинного тау у крові і СМР, а також оцінювання наявності комплексів C₂N-8E12-тау.

[0111] Дане дослідження призначено для реєстрації 32 суб'єктів з ПНП (24 у терапевтичній групі і 8 у групі плацебо). Суб'єкти розподіляються за 8 блоками по 4 пацієнти у кожному, де у кожному блоці випадковим чином відбирають одного пацієнта, якому вводиться плацебо, а у 3 оцінюється МПД. У разі прояву ДЛТ (дозолімітувальної токсичності) можуть бути залучені додаткові суб'єкти. Проте у процесі підвищення дози жодна з доз не має бути пропущена.

[0112] Метод неперервного переоцінювання (continual reassessment method, CRM) для підвищення дози використовується у тому вигляді, як описано у розділі статистичної моделі. Для визначення імовірності прояву ДЛТ використовується логістична модель.

[0113] C₂N-8E12 доставляється у клініку у вигляді замороженої рідини у окремих бутлях при номінальній концентрації 20 мг/мл. Кожний бутель містить 300 мг C₂N-8E12 і має зберігатися у замороженому стані при температурі від -70°C до -80°C.

[0114] Пацієнти піддаються відбору для оцінювання відповідності критеріям включення і виключення. Відбір також включає аналіз крові, СМР і МРТ. В день введення дози (день 0)

внутрішньовенно вводиться одноразова доза C₂N-8E12, і впродовж 24 годин після введення дози пацієнти знаходяться під ретельним наглядом у медичному закладі, який включає аналіз зразків крові на безпеку і оцінювання ФК параметрів. Впродовж наступних 3-х днів, а також одного і двох тижнів після інфузії, проводиться додаткове клінічне обстеження і відбір зразків крові. Через 4 дні після інфузії для додаткового оцінювання безпеки виконується МРТ і здійснюється відбір зразків СМР. Обстеження пацієнтів триває через кожні 28 днів, протягом не менше двох місяців з дня введення дози (наприклад, до дня 56). Після чого проводяться щомісячні вимірювання до появи будь-чого з наступних подій: (1) C₂N-8E12 більше не виявляється у крові; (11) спонсор визначає час завершення дослідження; (111) суб'єкт приймає рішення про дострокове припинення участі у дослідженні.

[0115] Мета дослідження фази 1 полягає у визначенні МПД згідно з оцінюванням безпеки, включаючи клінічні лабораторні тести, обстеження фізичного і неврологічного стану, а також прояв несприятливих подій, для визначення рекомендованого діапазону доз для оцінювання у подальшому дослідженні на фазі 2/MAD. Випадковий розподіл суб'єктів і включення групи, що одержує плацебо, дозволяє уникнути помилки випадкової вибірки і збільшує імовірність того, що відомі і невідомі чинники ризику будуть розподілені між терапевтичними групами рівномірно.

[0116] Комітет з моніторингу безпеки даних (КМБД) розглядає дані по безпеці про міру їх надходження. Комітет з моніторингу безпеки може складатися як мінімум з двох незалежних лікарів, одного біостатиста, одного лікаря з досвідом роботи з ПНП і одного представника від спонсора, який не має права голосу. Якщо у будь-якого суб'єкта, що бере участь у дослідженні, проявиться СНЯ (серйозне небажане явище), вивчаються всі доступні дані з безпеки по даному суб'єкту з метою визначення, чи відповідає ця подія визначенню ДЛТ, і чи була встановлена МПД. Якщо МПД не була встановлена, і пацієнт продовжує брати участь у дослідженні, КМБД надає рекомендації спонсорowi про наявність необхідності у додаткових діях або необхідності зміни протоколу для забезпечення у подальшому безпеки пацієнтів. Спонсор приймає остаточне рішення про будь-які зміни або про передчасне закінчення дослідження.

[0117] Дозолімітувальна токсичність визначається таким чином: (i) будь-яке небажане явище (НЯ) ступеня 3 або вище згідно з критерієм v2 загальної токсичності у ревматології, відносно якої є обґрунтована імовірність того, що ця подія викликана C₂N-8E12; (ii) будь-яке НЯ ступеня 2 при системноорганному класі порушень нервової системи і психіки згідно з критерієм загальної токсичності національного інституту раку США для НЯ v4.0. (CTCAE), яке вважається клінічно значущим, і відносно якого є обґрунтована імовірність того, що ця подія викликана C₂N-8E12; або (iii) будь-яка токсичність, пов'язана з інфузією (наприклад, алергічні реакції/гіперчутливість), що виникла у процесі інфузії C₂N-8E12 або впродовж 24 годин після завершення інфузії, яку не можна оперативно усунути шляхом зменшення швидкості інфузії і/або за допомогою підтримувальної терапії.

[0118] Підвищення дози: Розподіл суб'єктів за когортами дози, що вводиться, здійснюється згідно з наступними правилами: (1) у кожному блоці з 4 пацієнтів одному пацієнтові призначають плацебо; (2) для щонайменше 3 пацієнтів потрібна повна інформація про токсичність для рівня дози перед її підвищенням до більш високого рівня; (3) максимальне збільшення при підвищенні з однієї когорти у наступну становить 1 рівень дози; і (4) щонайменше 12 суб'єктів (3 блоки) повинні одержувати дозу на рівні дози, що дорівнює МПД.

[0119] У кожній когорті з 4 пацієнтів, пацієнтам послідовно вводять дози з мінімальним інтервалом щонайменше у два дні між введеннями дози наступним суб'єктам з тим, щоб забезпечити додатковий захід безпеки.

[0120] Першій когорті присвоюється d_i. Статистична модель оновлюється після одержання повної інформації про токсичність по кожній когорті. Згідно з правилом, одна додаткова когорта може бути введена до одержання повної інформації по всім суб'єктам самої останньої когорти. Неповні дані по токсичності допускаються не більше ніж для 3-х пацієнтів до реєстрації і рандомізації наступної когорти.

[0121] Кожній наступній когорті призначається доза, яка оцінюється на можливість її віднесення до МПД згідно з приведеним вище визначенням. У разі повільного приросту модель може бути оновлена, після реєстрації кожного пацієнта і кожного наступного пацієнта, що одержав поточну оцінку МПД.

[0122] Досліджувана популяція: Це дослідження проводиться за участю чоловіків і жінок з прогресуючим над'ядерним паралічем (ПНП) у віці від 50 до 85 років.

[0123] Критерії включення: Для включення у дослідження кожний суб'єкт має проявити бажання в участі і бути здатним на надання згоди, прийнятої на основі одержаної інформації. До початку протоколу лікування вона буде служити підтвердженням того, що кожний суб'єкт здатний дати згоду з протоколом лікування. Суб'єкти запрошуються для участі у дослідженні, і

після підписання форми про згоду, прийняту на основі одержаної інформації, проводиться процедура відбору. Якщо суб'єкти не відповідають критеріям включення або відповідають будь-якому з критеріїв виключення, вони не зараховуються для відбіркового оцінювання або у графік лікування.

5 [0124] Кожний суб'єкт має відповідати наступним критеріям для зарахування як учасника у цьому дослідженні: чоловік або жінка; вік від 50 до 85 років; відповідність можливим або імовірним критеріям NINDS-SPSP, модифікованим для NNIPPS і ALI08-231 клінічних випробувань, у тому числі: (d) над'ядерний параліч зору або зниження швидкості саккад, (ii) нестійка хода або падіння впродовж перших 3 років прояву симптомів; MPT головного мозку при скринінгу відповідає ПНП (<4 мікрогеморагій, відсутність великих інсультів або важкого захворювання білої речовини мозку); бали за рейтинговою шкалою ПНП від 20 до 50; здатність, перебуваючи у початковому стані, надати згоду, прийняту на основі одержаної інформації, на участь або, у разі нездатності дати згоду, прийняту на основі одержаної інформації, можливість одержання підтвердження на ділянці і наявність авторизованого медичного представника, який може дати згоду; наявність партнера за дослідженням, який наглядає за пацієнтом щонайменше 5 годин на тиждень, який може супроводжувати пацієнта під час відвідувань і згоден на участь у дослідженні; можливе одержання інших супутніх не-біологічних методів лікування, але доза має бути стабільною протягом щонайменше 30 днів до реєстрації; в змозі зробити 5 кроків з наданням мінімальної допомоги (стабілізація однієї руки або використання тростини/ходунків); стабільний прийом лікарських препаратів при паркінсонізмі щонайменше впродовж 2 місяців до відбору, включаючи леводоп, агоністи дофаміну, разагалін, інгібітори КОМТ, амантадин, мемантин або інгібітори холіноестерази; згода на проведення максимум 3-х поперекових пункцій впродовж 4-18 місяців, 6 поперекових пункцій, якщо суб'єкт бере участь у дослідженні в обох фазах: 1/SAD і 2/MAD; одержання від суб'єкта підписаної і датованої письмової згоди на основі одержаної інформації; згода на використання методів контрацепції, вказаних у протоколі (див. нижче).

[0125] Суб'єкти, які відповідають будь-якому з наступних критеріїв виключаються з дослідження: ознаки прогресуючого неврологічного розладу, які краще відповідають критеріям для типів неврологічних розладів, відмінних від ПНП, у тому числі: (a) відповідають критеріям імовірної хвороби Альцгеймера або (b) відповідають діагностичним показникам деменції при хворобі Паркінсона з тільцями Леві, множинної системної атрофії (МСА) або аміотрофічного бічного склерозу (АБС); будь-які злоякісні новоутворення (окрім неметастатичної базально-клітинної карциноми шкіри) впродовж 5 років скринінгу; клінічно значуща ниркова або печінкова дисфункція при скринінгу згідно з професійним оцінюванням дослідника; клінічно значуще порушення серцево-судинної системи впродовж трьох місяців до початку дослідження, згідно з професійним оцінюванням дослідника; клінічно значущі аномальні результати гематологічних або хімічних лабораторних тестів під час скринінгу згідно з професійним оцінюванням дослідника; проходження будь-якої попередньої терапії моноклональними антитілами з будь-якої причини впродовж останніх 90 днів або введення будь-якого іншого досліджуваного агента у попередні 30 днів або 5 періодів напіврозпаду (залежно від того, що довше). Попереднє введення C₂N-8E12 не належить до цих критеріїв виключення і, отже, не впливає на відхилення суб'єкта від участі у дослідженні на фазі 2/MAD; одержання на даний момент будь-якої іншої біологічної або імунотулюювальної терапії; тривалість захворювання більше 5 років з моменту появи симптомів; об'єм середнього мозку >8600 мм³ на знімку MPT; проживання у закладах з кваліфікованим медичним доглядом або доглядом за недоумкуватими пацієнтами; наявність чітких показників захворювання рухових нейронів при обстеженні, згідно з БАС патологією (описано у носіїв C90RF72 з наявністю КБС); діагностика інших значущих неспоріднених неврологічних або психічних розладів, які можна віднести до когнітивних порушень (наприклад, активна форма епілепсії, інсульт, судинна деменція), згідно з професійним оцінюванням дослідника; запущена глибока депресія при початковому оцінюванні згідно з клінічним оцінюванням і результатами у GDS; випадки інших глибоких психічних розладів; будь-які раніше наявні випадки суїцидальних спроб; важкі когнітивні порушення, оцінені за шкалою MMSE (<17), які, на думку дослідника, виключають збір результатів вимірювання; нездатність брати участь у протоколі оцінювання; значущі, аномальні значення, одержані в цілому зі зразків крові, взятих під час відбору, які будть викликати загрозу безпеці або заважати відповідній інтерпретації даних дослідження; поточна або така, що нещодавно мала місце (впродовж чотирьох тижнів до відбору) клінічно значуща бактеріальна, грибова або мікробактеріальна інфекція; нездатність переносити MPT сканування під час скринінгу або будь-яке інше протипоказання до MPT; будь-яке протипоказання або нездатність переносити спинномозкову пункцію при відборі, у тому числі введення антикоагулянтних препаратів, таких як варфарин. Щоденне введення 81 мг

аспірину або аналогічних антикоагулянтів може бути дозволено за умови, що доза є стабільною впродовж 30 днів до скринінгу; суб'єкти, які, на думку дослідника, не можуть або навряд чи зможуть дотримуватися графіку дозування або оцінювання дослідження; участь у іншому інтервенційному клінічному випробуванні впродовж 3-х місяців відбору; лікування за допомогою іншого досліджуваного препарату впродовж 30 днів відбору; будь-які, що існували раніше QTcF тривалістю більше 450 мс; суб'єкт є працівником або членом сім'ї спонсора або співробітником місця проведення дослідження або членом його сім'ї.

[0126] Суб'єкти мають дати згоду на застосування (і/або застосування їх партнером) прийнятних методів контрацепції, починаючи з початкового візиту впродовж всього дослідження і впродовж 56 днів після останньої дози досліджуваного препарату у останній період лікування. Прийнятні методи контрацепції перераховані нижче.

[0127] Досліджуваний лікарський засіб: На фазі 1/SAD дослідження використовується C₂N-8E12 з DP лота № 1018775 - матеріал з банку клітин для дослідження (RCB), що використовується нині під індексом 119404 для розширеного доступу (Expanded Access IND). Віо знаходиться у 25 мМ ацетатному буфері (pH 5,5) з концентрацією 20 мг/мл Плацебо: Плацебо готується аналогічно C₂N-8E12, але не містить лікарський засіб, що вивчається, як активна речовина.

[0128] Обґрунтування дози: Максимальну рекомендовану початкову дозу (МРСД) розраховують згідно з посібником управління по контролю за харчовими продуктами і лікарськими препаратами (FDA) для промислового "Оцінювання безпечної стартової дози у клінічних випробуваннях для терапії у дорослих здорових добровольців". Згідно з посібником, для досліджуваних терапевтичних білків з молекулярною масою >100000 дальтон, які вводяться внутрішньовенно, МРСД слід оцінювати шляхом нормалізації по всіх видах, а не шляхом масштабування площі поверхні тіла. Виходячи з рівня, при якому не спостерігається ефект (NOEL), що дорівнює 250 мг/кг у токсикологічному дослідженні на мишах, доза до 25 мг/кг обмежена стандартним коефіцієнтом безпеки 10.

[0129] Стартова доза для дослідження на фазі 1/SAD становить 2,5 мг/кг для в/в введення. Ця стартова доза у 10 разів нижча, ніж максимально дозволена стартова доза згідно з 4тижневим токсикологічним дослідженням на мишах, і у 6 разів нижча, ніж поточна максимальна доза (15 мг/кг), що вводиться згідно з протоколом лікування людини у режимі розширеного доступу і застосування препарату з міркувань гуманності відносно C₂N-8E12 (див. брошуру дослідника).

[0130] Виходячи з попередніх ФК параметрів плазми, одержаних у одиничному дослідженні пацієнтів, можна оцінити відсоток тау у СМР, який зв'язується з C₂N-8E12 через різні проміжки часу після введення 2,5 мг/кг дози C₂N-8E12. Для проведення такого обчислення передбачається, що концентрація гуманізованих антитіл у СМР становить 0,1 % від їх концентрації у плазмі крові, і що концентрація тау у СМР становить 500 пг/мл. Виходячи з цього припущення, доза, що дорівнює 2,5 мг/кг буде давати у перший місяць концентрацію C₂N-8E12 у СМР у 3-40 разів вище за молярну концентрацію тау у СМР. Враховуючи K_d для C₂N8E12, при дозі, що дорівнює 2,5 мг/кг, 3-26 % тау у СМР буде зв'язано з антитілом. Аналогічне моделювання здійснювали на основі ФК даних, одержаних під час введення пацієнтам найвищої дози на сьогоднішній день (15 мг/кг) і оцінили, що середній рівень зв'язування тау впродовж 28 днів становить приблизно 50 % (максимальне зв'язування - 72 %, а мінімальне - 40 %). Імовірно, у головному мозку присутня надмірна кількість позаклітинного тау, не доступного через СМР компартмент, але з яким антитіло здатне зв'язуватися. Отже, підвищення дози здійснюють до 25 мг/кг для оцінювання безпеки дози, яка може забезпечити значущу взаємодію з мішенню у головному мозку.

[0131] Якщо не схвалено дослідником, впродовж періоду лікування суб'єкт не повинен одержувати: ніяке інше біологічне або імуномодулювальне лікування; ніякий інший агент, що проходить клінічне випробування; варфарин; будь-який антикоагулянт (окрім щоденного прийому 81 мг аспірину) у стані, при якому тимчасове припинення лікування до відбору проб СМР може виявитися небезпечним для здоров'я.

[0132] Згода на основі одержаної інформації: Після одержання згоди на основі одержаної інформації кожний суб'єкт проходить відбір з метою підтвердження його відповідності критеріям включення і відсутності будь-яких протипоказань для одержання лікування згідно з цим протоколом. Зокрема, кожний суб'єкт оцінюється при відборі шляхом проведення клінічного і неврологічного обстеження для підтвердження діагнозу. Короткий відбір за когнітивними здібностями проводиться за допомогою шкали бального оцінювання симптомів ПНП і шкали депресії шляхом опитування для одержання визначеного медичного і лікарського анамнезу. Якщо суб'єкт задовольняє всім критеріям включення, при цьому показання, що відповідають

критеріям виключення, відсутні, проводиться подальше дослідження. Візит по відбору призначається за 28-7 днів до початкового/день 0 візиту.

[0133] Оцінювання фармакокінетичних параметрів: Для аналізу ФК параметрів відбирають зразки у різні моменти часу, як зазначено нижче у таблиці 3.

Таблиця 3

Перед введенням	15 хв (#)	3 години	6 годин	12 годин	24 години	48 годин	168 годин	336 годин	28 днів	Після 28 днів
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	@

5

(*) У разі дострокового припинення, остаточний зразок крові одержують під час візиту за достроковим припиненням для остаточного оцінювання ФК параметрів;

(#) в межах 15 хвилин після закінчення інфузії;

10 (@) після 28-го дня зразки для аналізу ФК відбирають кожні 28 днів до появи будь-якої з наступних подій: (i) припинення дослідження; (ii) відсутність рівнів C₂N-8E12, що детектуються у крові.

15 [0134] Оцінювання небажаних реакцій (НР): З метою контролю НЯ проводиться наступне оцінювання: життєво важливих показників (артеріальний тиск, пульс/частота серцевих скорочень, температура, частота дихання, SPO₂); повне неврологічне обстеження, у тому числі оцінювання когнітивних показників (тести на оцінювання психічного статусу); лабораторні тести: (1) гематологічний аналіз крові: загальний аналіз крові (CBC) з підрахуванням формених елементів, гематокриту і гемоглобіну (Hb), кількість тромбоцитів; (2) біохімічний аналіз крові: електроліти сироватки крові, глюкоза, сечова кислота, азот сечовини крові (АСК), креатинін, загальний білок, альбумін, білірубін (загальний, прямий і непрямий), лужна фосфатаза, лактатдегідрогеназу (ЛДГ), ферменти печінки (АСТ, АЛТ і ГГТ), залізо, аналіз холестерину, КФК, амілаза, ліпаза і; (3) аналіз параметрів коагуляції: протромбіновий час (ПЧ), МНВ і частковий тромбoplastиновий час (ЧТЧ); аналіз сечі, включаючи вимірювання вмісту Hb, WBC і білка; ЕКГ - неперервний моніторинг або ЕКГ у 12 відведеннях; одержання МРТ зображення мозку, у тому числі методом інверсія-відновлення з послабленням сигналу від рідини (FLAIR); відбір зразків

20

25 СМР з підрахуванням кількості клітин крові (WBC і RBC) і вимірювання рівня загального білка і глюкози.

30 [0135] Визначення C₂N-8E12 у людській плазмі і СМР: Для вимірювання концентрації C₂N-8E12 у плазмі крові і СМР були розроблені сендвіч-ІФА методи аналізу. Ці тести перевіряли на достовірність на різних планшетах у лабораторіях Чарльз Рівер (Charles R1ver) (див. таблицю 4).

Таблиця 4

Дослідження CRL #	Назва дослідження
20056682 Завершено	Оцінювання достовірності способу імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA (ензим-зв'язаного імуносорбентного аналізу)) для визначення C ₂ N-8E12 у людській плазмі (K ₂ EDTA)
20057088 Завершено	Оцінювання достовірності способу імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA (ензим-зв'язаного імуносорбентного аналізу)) для визначення C ₂ N-8E12 у людській спинномозковій рідині

35 [0136] Визначення анти-C₂N-8E12 антитіл у людській плазмі крові: Зразки крові відбирають для оцінювання розвитку антитіл до лікарського препарату (ADA) до введення стартової дози і на 14-ий і 28-ий дні після введення препарату. Фінальне вимірювання виконують при завершенні. Для вимірювання наявності антитіл проти C₂N-8E12 у плазмі (ADA) розробили сендвіч-ІФА, заснований на ЕХЛ. Цей аналіз для виявлення реакції на ADA у людській плазмі крові перевіряли на достовірність у лабораторіях Чарльз Рівер (Charles R1ver) (таблиця 5).

Таблиця 5

Дослідження CRL #	Назва дослідження
20056686 Завершено	Оцінювання достовірності кількісного електрохемілюмінесцентного аналізу (ЕХЛ) для виявлення анти-С ₂ N-8Е12 антитіл у людській плазмі (К ₂ ЕДТА)

- [0137] Клінічний і функціональний аналіз включають колумбійську шкалу оцінювання тяжкості суїциду (Colombia-Suicide Severity Rating Scale): Як параметр безпеки, використовують колумбійську шкалу оцінювання тяжкості суїциду (C-SSRS) для виявлення суїцидальних схильностей (Posner et al., 2011). Геріатрична шкала депресії: За аналогією з C-SSRS, геріатричну шкалу депресії (GDS) використовують для оцінювання загального настрою у ході дослідження. Геріатрична шкала депресії (GDS) є аналізом на основі анкети-самозвіту з 30 пунктів, що використовується для виявлення депресії у літніх людей (Yesavage et al., 1983).
- 10 Шкала бального оцінювання симптомів ПНП: Шкалу бального оцінювання симптомів ПНП (PSPRS) використовують при відборі на включення, а також спочатку і у кінці дослідження для оцінювання змін за шкалою протягом часу (Golbe and OhmanStrickland, 2007). Загальне клінічне враження: Шкали оцінювання зміни загального клінічного враження (CGIC) і тяжкості захворювання (CGI) використовують для оцінювання тяжкості симптомів. Шкала повсякденної активності Шваба і Англії: Шкалу повсякденної активності Шваба і Англії (SEADL) використовують як засіб оцінювання здатності суб'єктів виконувати повсякденну роботу (Schwab and England 1969). Клінічне оцінювання деменції за допомогою суми боксируваних балів при лобово-скроневій лобарній дегенерації: Клінічне оцінювання деменції за допомогою суми боксируваних балів при лобово-скроневій лобарній дегенерації (CDR-SB-FTLD) являє собою версію тесту CDR-SB на оцінювання когнітивних здібностей, яке включає оцінювання поведінки, манер, особи і мови (Knopman et al., 2008). Коротке дослідження психічного стану: Коротке дослідження психічного стану (MMSE) являє собою об'єктивне опитування з 30 пунктів для вимірювання когнітивних порушень (Folstein, Folstein, and McHugh, 1975).
- 15 [0138] Спинномозкова рідина: СМР відбирається з проміжку L3-4 шляхом люмбальної пункції. Якщо відбір зразка СМР виявився невдалим, то на розсуд місцевого медперсоналу можна провести люмбальну пункцію під контролем КТ/флюороскопії згідно з місцевим протоколом. Дані лабораторного аналізу на безпеку на основі зразків СМР аналізують на місці на відповідному клінічному майданчику після кожної люмбальної пункції/збору СМР. Ці заходи включають: підрахування клітин (WBC і RBC), визначення вмісту загального білка і глюкози. Інші вимірювання параметрів СМР (наприклад, концентрація С₂N-8Е12, взаємодія з мішенню і інші пошукові біомаркери) аналізують у відповідним чином оснащених лабораторії.
- 20 [0139] Одержання зображення: На початку дослідження суб'єкт також піддається процедурі МРТ з одержанням структурного, FLAIR, дифузно-зваженого за чутливістю зображення. Аналіз зображення, одержаного після введення препарату здійснюється згідно з графіком заходів.
- 25 [0140] Дослідницький фармакогеномний аналіз: Зразок крові відбирається для виділення ДНК на початку дослідження. Всі індивідууми піддаються розширеному аналізу послідовності МАРТгаплотипу для визначення статусу носія Н1(А-Д) і Н2. ДНК виділяють зі зразків і вводять у визначене фармакогеномне ядро для цього дослідження.
- 30 [0141] Суб'єкти беруть участь у даному дослідженні до появи будь-якої з наступних подій: (i) вони завершили свою участь і пройшли весь графік заходів; (ii) вони або дослідник вирішив що їх участь має бути завершена; або (iii) у прийнятого суб'єкта спостерігається будь-яка ДЛТ або будь-яке СНЯ, відносно якого дослідник приймає рішення про припинення подальшої участі у цьому дослідженні і виключає з участі у дослідженні на наступній 2/МAD фазі. Крім того, на розсуд дослідника, суб'єкти, які перестають задовольняти будь-якому критерію включення або
- 35 відповідають одному або декільком критеріям виключення в ході дослідження, можуть бути визначені як невідповідні для продовження участі у дослідженні або у подальшій участі у дослідженні на 2/МAD фазі.
- 40
- 45

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> C2N DIAGNOSTICS, LLC

<120> ГУМАНІЗОВАНИ АНТИ-ТАУ АНТИТІЛА

<130> ABV12215W0

<150> PCT/US2015/038002

<151> 2015-06-26

<150> 62/170,036

<151> 2015-06-02

<150> 62/080,903

<151> 2014-11-17

<150> 62/018,436

<151> 2014-06-27

<160> 58

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 111

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

Arg	Tyr	Ser	Tyr	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			

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

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

Pro	Leu	Glu	Glu	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	His	Ser	Trp
				85					90					95	

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

<210> 2
 <211> 111
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

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

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
 85 90 95

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

<210> 3
 <211> 111
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
85 90 95

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

<210> 4

<211> 111

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
85 90 95

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

<210> 5
 <211> 124
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

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

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120

<210> 6
 <211> 124
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Glu Val Lys Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120

<210> 7

<211> 124

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120

<210> 8

<211> 124

<212> Билок

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120

<210> 9
 <211> 6
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Asp Gln Gly Gly Tyr Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 8
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln
 1 5

<210> 11
 <211> 111
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Pro Leu Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
 85 90 95

Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 12
 <211> 124
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Glu Val Lys Val Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120

<210> 13
 <211> 442
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Glu Val Lys Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 260 265 270
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 290 295 300
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 340 345 350
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 405 410 415
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 14
 <211> 442
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Glu Val Lys Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

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

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

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 15

<211> 442

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 16

<211> 442

<212> Билок

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 17

<211> 218

<212> Билнок

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Pro Leu Glu Glu Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

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

<210> 18
 <211> 218
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

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

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

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

<210> 19
<211> 218
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 19
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

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

<210> 20
<211> 218
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 20
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

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

<210> 21

<211> 60

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly
50 55 60

<210> 22
 <211> 60
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Asp Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Glu Gly Tyr Thr Met Leu
 20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45

Gln Thr Pro Ala Glu Asp Gly Ser Glu Glu Leu Gly
 50 55 60

<210> 23
 <211> 49
 <212> Білок
 <213> Mus musculus

<400> 23
 Met Ala Asp Pro Arg Gln Glu Phe Asp Thr Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Tyr Thr Leu Leu Gln Asp Gln Glu Gly Asp Met Asp His Gly Leu
 20 25 30

Lys Glu Ser Pro Pro Gln Pro Pro Ala Asp Asp Gly Ala Glu Glu Pro
 35 40 45

Gly

<210> 24
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Ala Ala Lys Asp Gln Gly
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 26

His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 27

His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Ala Ala Asp Gln Gly Gly
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr
1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Ala Ala Gln Gly Gly Tyr
1 5 10 15

<210> 30
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Ala Ala Gly Gly Tyr Thr
 1 5 10 15

<210> 32
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Ala Ala Gly Tyr Thr Met
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Ala Ala Tyr Thr Met His
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Ala Ala Thr Met His Gln
 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp
 1 5 10 15

<210> 39
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Ala Ala Met His Gln Asp
 1 5 10 15

<210> 40
 <211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 40

Gly	Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His	Gln	Asp	Gln
1				5					10					15

<210> 41

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly	Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Ala	Ala	His	Gln	Asp	Gln
1				5					10					15

<210> 42

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 42

Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His	Gln	Asp	Gln	Glu
1				5					10					15

<210> 43

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 43

Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Ala	Ala	Gln	Asp	Gln	Glu
1				5					10					15

<210> 44

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 44

Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His	Gln	Asp	Gln	Glu	Gly
1				5					10					15

<210> 45

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 45

Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met Ala Ala Asp Gln Glu Gly
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 46

Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 47

Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Ala Ala Gln Glu Gly Asp
1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 48

Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr
1 5 10 15

<210> 49

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 49

Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Ala Ala Glu Gly Asp Thr
1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp
1 5 10 15

<210> 51
<211> 15
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 51
Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Ala Ala Gly Asp Thr Asp
1 5 10 15

<210> 52
<211> 15
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 52
Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala
1 5 10 15

<210> 53
<211> 15
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 53
Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Ala Ala Asp Thr Asp Ala
1 5 10 15

<210> 54
<211> 15
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 54
Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly
1 5 10 15

<210> 55
<211> 5
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400> 55
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 56
<211> 22
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(8)
<223> Будь-яка амінокислота або не присутній

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(22)
<223> Будь-яка амінокислота або не присутній

<400> 56
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20

<210> 57
<211> 8
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> His or Leu

<400> 57
Gly Tyr Thr Met Xaa Gln Asp Gln
1 5

<210> 58

<211> 6
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Gly or Glu

 <400> 58
 Asp Gln Xaa Gly Tyr Thr
 1 5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Виділене анти-тау антитіло, що містить:
 - легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і
 - важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5.
2. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що антитіло є гуманізованим IgG4 антитілом, що містить мутацію S241P, яка стабілізує шарнірну область.
- 10 3. Виділене моноклональне анти-тау антитіло, що містить легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18, і важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13.

ПОСЛІДОВНІСТЬ ВАРІАБЕЛЬНИХ ДІЛЯНОК

Послідовності C2N-щеплених V ділянок

Легкий ланцюг

	CDR1	CDR2	CDR3	
MuVL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLNHPLEEDDAATYYCHHSWEIPLTFGAGTKLELK			(SEQ ID NO:11)
VK1	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLNHPLEEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIK			(6) (SEQ ID NO:1)
VK2	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLNHPLEEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIK			(7) (SEQ ID NO:2)
VK3	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIK			(11) (SEQ ID NO:3)
VK4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIK			(12) (SEQ ID NO:4)

Важкий ланцюг

	CDR1	CDR2	CDR3	
MuVH	EVKVEESGGGLVQPGGSKLSCVVSGETFSPNYWVNWVRQAPGKLEWVAQIRLKSNDYATHYEEESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRADDSGIYYCTNWEDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVF			(SEQ ID NO:12)
VH1	EVKVEESGGGLVQPGGSKLSCVVSGETFSPNYWVNWVRQAPGKLEWVAQIRLKSNDYATHYEEESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRADDSGIYYCTNWEDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVF			(4)
VH2	EVKVEESGGGLVQPGGSKLSCVVSGETFSPNYWVNWVRQAPGKLEWVAQIRLKSNDYATHYEEESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRADDSGIYYCTNWEDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVF			(7)
VH3	EVQVVEESGGGLVQPGGSKLSCVVSGETFSPNYWVNWVRQAPGKLEWVAQIRLKSNDYATHYEEESVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNLRADDTAIYYCTNWEDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVF			(10)
VH4	EVQVVEESGGGLVQPGGSKLSCVVSGETFSPNYWVNWVRQAPGKLEWVAQIRLKSNDYATHYEEESVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNLRADDTAIYYCTNWEDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVF			(12)

Ключ:

Mu: означає мишину послідовність
 VH: означає гуманізовану варіабельну ділянку важкого ланцюга
 VL: означає гуманізовану варіабельну ділянку легкого ланцюга
 CDR: визначальна комплементарність ділянка
 AAA: зміни у каркасній ділянці, запропоновані Antitope

ФІГ. 1

Повна амінокислотна послідовність варіантів важкого ланцюга та легкого ланцюга C₂N

Щеплені варіанти важкої послідовності

Теоретичне pI/Mw для gVH1: 6.80 / 48822.90

EVKVVESGGGLVQPGGSMKLSGVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKSNDYATHYEESVKGRFTISR
DSKSSVYLQMNRLRAEDSGIYYCTNWEDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
(SEQ ID NO:13)

ФІГ. 2А

Повна амінокислотна послідовність варіантів важкого ланцюга та легкого ланцюга C₂N

Щеплені варіанти важкої послідовності

Теоретичне pI/Mw для gVH2: 6.80/48791.87

EVKVVESGGGLVQPGGSLKLSGVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKSNDYATHYEESVKGRFTISR
DSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTNWEDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
(SEQ ID NO:14)

ФІГ. 2В

Повна амінокислотна послідовність варіантів важкого ланцюга та легкого ланцюга C₂N

Щеплені варіанти важкої послідовності

Теоретичне pI/Mw для gVH3: 6.51 /48832.88

EVQVVESGGGLVQPGGSLKLSGVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKSNDYATHYEESVKGRFTISR
DSKNSVYLQMNRLRAEDTAIYYCTNWEDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
(SEQ ID NO:15)

ФІГ. 2С

Повна амінокислотна послідовність варіантів важкого ланцюга та легкого ланцюга C₂N

Щеплені варіанти важкої послідовності

Теоретичне pI/Mw для gVH4: 6.51 /48860.93

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSGVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKSNDYATHYEESVKGRFTISR
DSKNSLYLQMNRLRAEDTAIYYCTNWEDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
(SEQ ID NO:16)

ФІГ. 2D

Повна амінокислотна послідовність варіантів важкого ланцюга та легкого ланцюга C₂N

Grafted Light Chain Variants

Теоретичне pI/Mw для gVL1: 6.08 / 24100.81

DIVLTQSPDLSAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWHYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDF
TLNIHPLEEEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:17)

ФІГ. 2Е

Повна амінокислотна послідовність варіантів важкого ланцюга та легкого ланцюга C₂N

Щеплені варіанти легкої послідовності

Теоретичне pI/Mw для gVL2: 6.33 / 24068.81

DIVLTQSPDLSAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWHYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDF
TLNIHPLEPEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:18)

ФІГ. 2F

Повна амінокислотна послідовність варіантів важкого ланцюга та легкого ланцюга C₂N

Щеплені варіанти легкої послідовності

Теоретичне pI/Mw для gVL3: 6.57 / 23994.72

DIVLTQSPDLSAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWHYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:19)

ФІГ. 2G

Повна амінокислотна послідовність варіантів важкого ланцюга та легкого ланцюга C₂N

Щеплені варіанти легкої послідовності

Теоретичне pI/Mw для gVL4: 6.57 / 24012.76

DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWHYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:20)

ФІГ. 2H

Дані транзйентної експресії для гуманізованих варіантів

Гуманізований варіант	Транзйентна експресія, Цикл 1 (мкг/мл)	Транзйентна експресія, Цикл 2 (мкг/мл)
VH1/VK1	9.0	
VH1/VK2	13.4	13.1
VH1/VK3	22.2	20.2
VH1/VK4	12.4	
VH2/VK1	6.5	
VH2/VK2	11.3	6.2
VH2/VK3	13.7	13.8
VH2/VK4	9.3	
VH3/VK1	7.3	
VH3/VK2	12.0	8.1
VH3/VK3	15.2	15.9
VH3/VK4	6.4	
VH4/VK3	3.6	

ФІГ. 3

Аналіз активності

Антитіло	IC50 (відносно химери)		
	Прогін 1 C ₂ N	Прогін 2 C ₂ N	Зовнішній
Химера	1.00	1.00	1.00
VH1/VK1	1.49	1.11	0.84
VH1/VK2	1.34	0.91	0.78
VH1/VK3.1	1.58	0.92	0.79
VH1/VK3.2	1.93	1.07	1.02
VH1/VK4	2.05	1.02	1.41
VH2/VK1	1.43	1.02	1.02
VH2/VK2	1.37	0.85	1.12
VH2/VK3	1.17	0.97	0.94
VH2/VK4	1.36	1.03	1.37
VH3/VK1	1.16	1.42	1.04
VH3/VK2	0.81	1.28	0.94
VH3/VK3	0.84	1.34	0.93
VH3/VK4	0.89	1.22	1.51
VH4/VK3	1.79	1.9	1.31
HJ8.5	0.79	0.99	1.07

ФІГ. 4

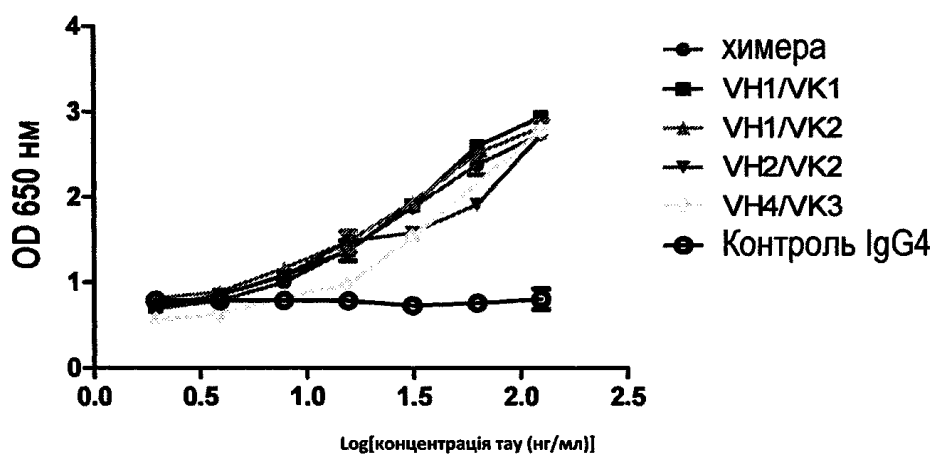
Кінетика зв'язування антитіла до людського тау

Гуманізований варіант	Константа асоціації K_a (1/Мсек)	Константа дисоціації K_d (1/сек)	Афінність K_D (М)
Химера	7.21E+05	1.43E-03	1.99E-09
VH1/VK2	3.02E+05	6.21E-04	2.06E-09
VH1/VK4	2.87E+05	5.99E-04	2.09E-09
VH2/VK3	2.73E+05	6.08E-04	2.23E-09
VH2/VK4	2.80E+05	5.93E-04	2.13E-09
VH3/VK3	2.76E+05	5.15E-04	1.88E-09
VH3/VK4	2.65E+05	5.07E-04	1.92E-09

ФІГ. 5

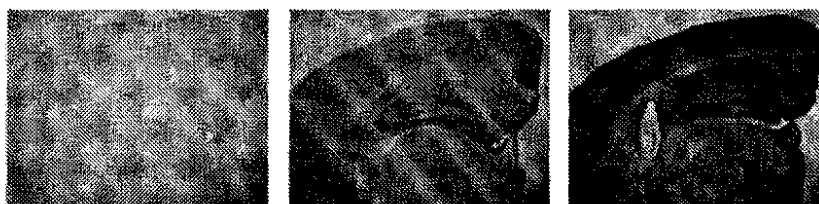
Зв'язування гуманізованого антитіла

Тау сендвіч-ІФА 03152013



ФІГ. 6

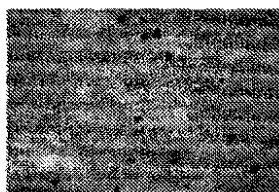
Зв'язування гуманізованих антитіл з людським тау у головному мозку миші та людини



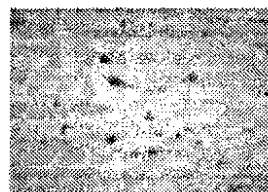
Миша дикого типу

4-місячна миша P301S

9-місячна миша P301S



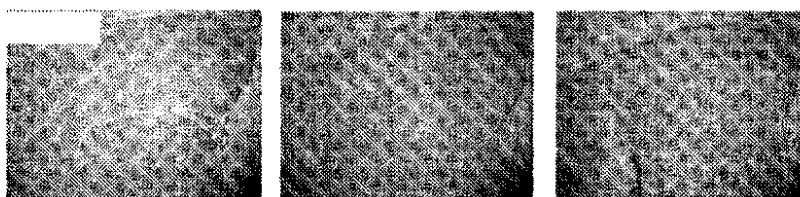
Людина з ПНП (штам wHJ8.5)



Тканина № 2 кори людини з ХА

Зв'язування химери (позитивний контроль) в мишиній та людській тканинах

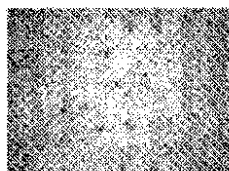
ФІГ. 7А



Миша дикого типу

4-місячна миша P301S

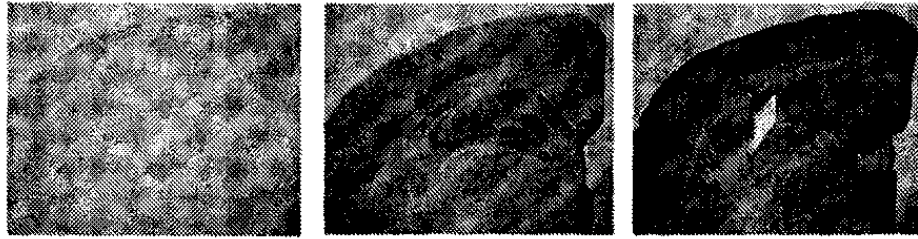
9-місячна миша P301S



Тканина № 2 кори людини з ХА

Зв'язування неспецифічного людського IgG4 (негативний контроль) в мишиній та людській тканинах

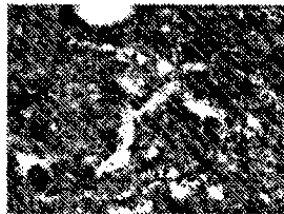
ФІГ. 7В



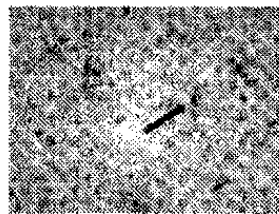
Миша дикого типу

4-місячна миша P301S

9-місячна миша P301S



Людина з ПНП



Тканина № 2 кори людини з ХА

Зв'язування VN1/VK2 в мишиній та людській тканинах

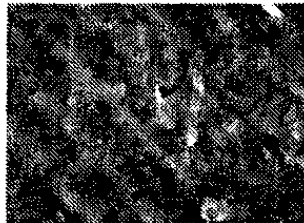
ФІГ. 7С



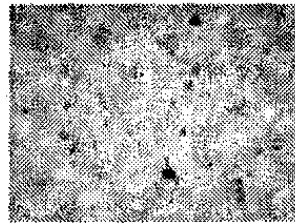
Миша дикого типу

4-місячна миша P301S

9-місячна миша P301S



Людина з ПНП



Тканина № 2 кори людини з ХА

Зв'язування VN1/VK3 в мишиній та людській тканинах

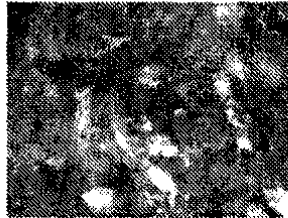
ФІГ. 7D



Миша дикого типу

4-місячна миша P301S

9-місячна миша P301S



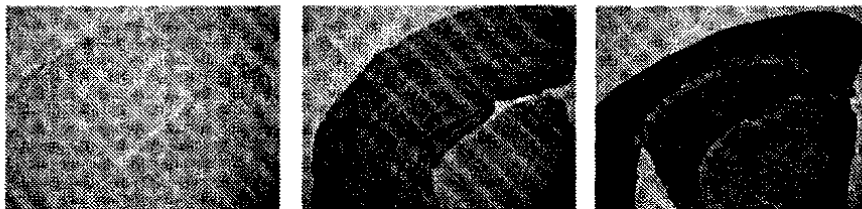
Людина з ПНП



Тканина № 2 кори людини з ХА

Зв'язування VH2/VK2 в мишиній та людській тканинах

ФІГ. 7Е



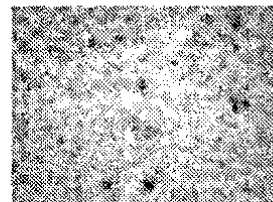
Миша дикого типу

4-місячна миша P301S

9-місячна миша P301S



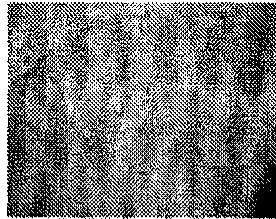
Людина з ПНП



Тканина № 2 кори людини з ХА

Зв'язування VH2/VK3 в мишиній та людській тканинах

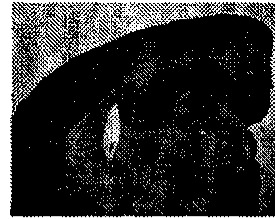
ФІГ. 7Б



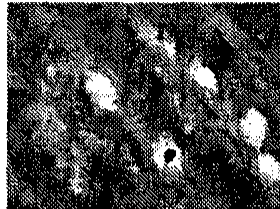
Миша дикого типу



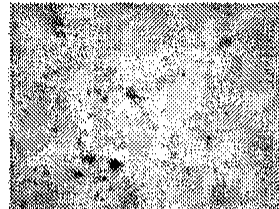
4-місячна миша P301S



9-місячна миша P301S



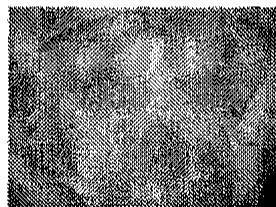
Людина з ПНП



Тканина № 2 кори людини з ХА

Зв'язування VH3/VK2 в мишиній та людській тканинах

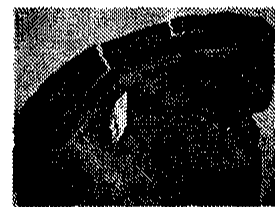
ФІГ. 7G



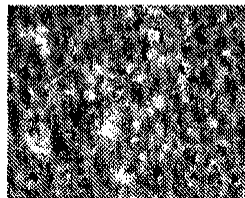
Миша дикого типу



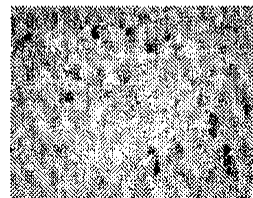
4-місячна миша P301S



9-місячна миша P301S



Людина з ПНП

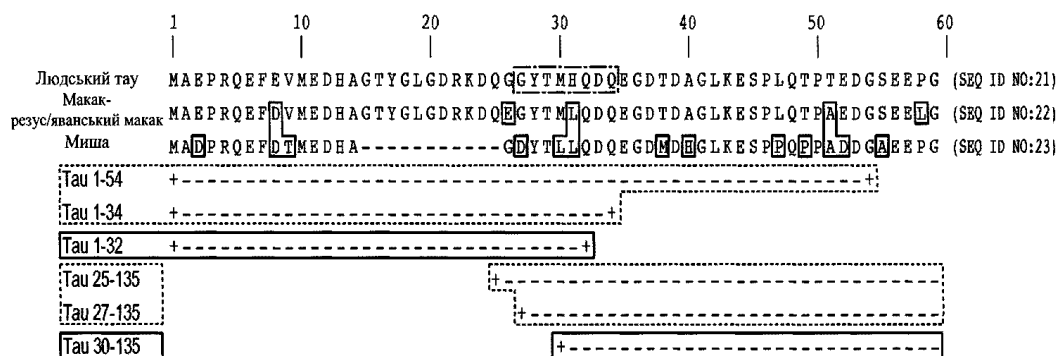


Тканина № 2 кори людини з ХА

Зв'язування VH3/VK3 в мишиній та людській тканинах

ФІГ. 7H

Картування епітопа у HJ8.5

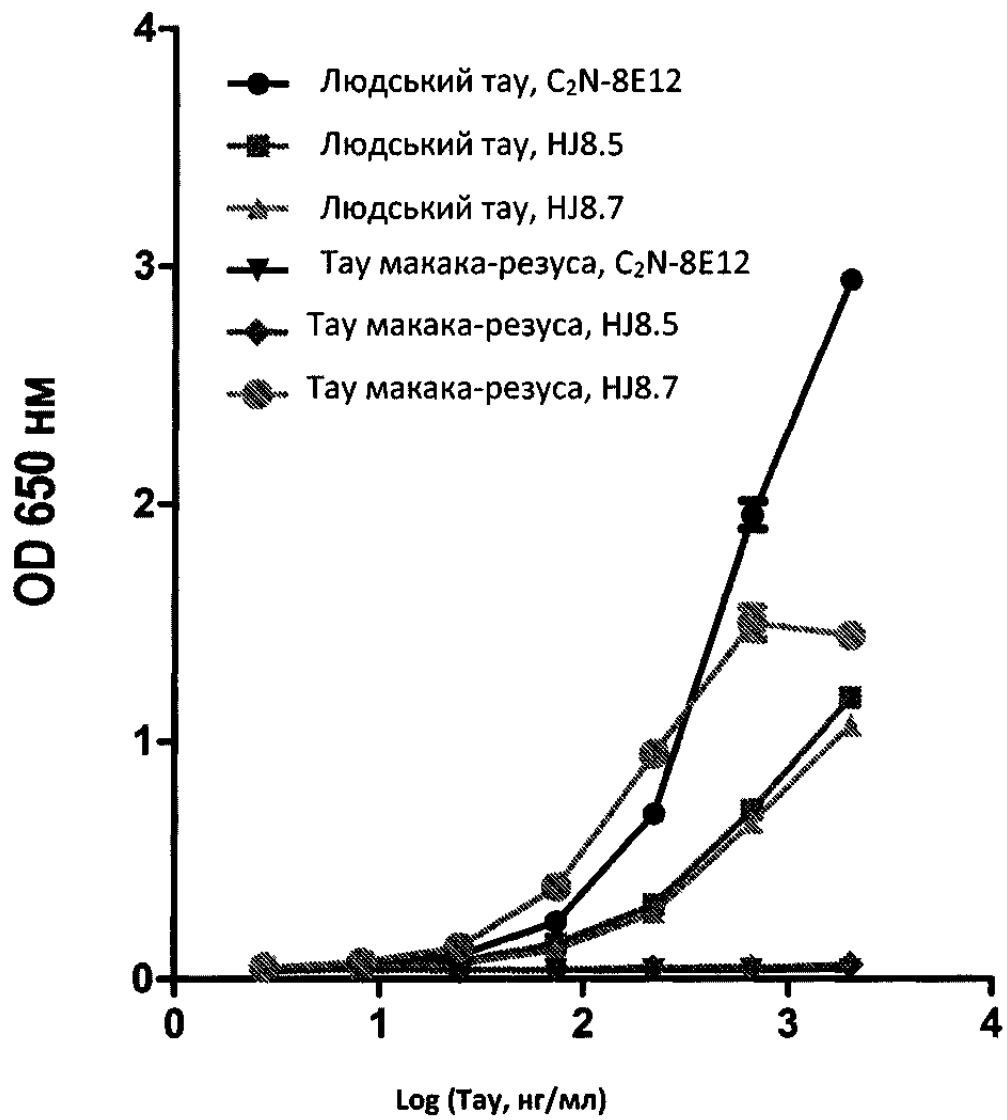


ФІГ. 8

		Антитіла	Корові епітопи		
		HJ8.5 і C ₂ N-8E12	2 ⁸ DQGGYT ₃₀ (SEQ ID NO:9)		
PeptideLabData	ПОСЛІДОВНІСТЬ	Ідентифі-катор	МІТКА	HJ8.5 (Сигнал зв'язування)	C ₂ N-8E12 (Сигнал зв'язування)
PEP_2875800	DHAGTYGLGDRKDQG	SEQ ID NO:24	LIN	61	78
PEP_2875801	DHAGTYGLGAAKDQG	SEQ ID NO:25	LIN.AA	52	90
PEP_2875802	HAGTYGLGDRKDQGG	SEQ ID NO:26	LIN	63	65
PEP_2875803	HAGTYGLGDAADQGG	SEQ ID NO:27	LIN.AA	51	65
PEP_2875804	AGTYGLGDRKDQGGY	SEQ ID NO:28	LIN	427	1286
PEP_2875805	AGTYGLGDRAAQGGY	SEQ ID NO:29	LIN.AA	58	76
PEP_2875806	GTYGLGDRKDQGGYT	SEQ ID NO:30	LIN	2638	1714
PEP_2875807	GTYGLGDRKAAGGYT	SEQ ID NO:31	LIN.AA	110	114
PEP_2875808	TYGLGDRKDQGGYTM	SEQ ID NO:32	LIN	2640	2588
PEP_2875809	TYGLGDRKDAAGYTM	SEQ ID NO:33	LIN.AA	2814	2755
PEP_2875810	YGLGDRKDQGGYTMH	SEQ ID NO:34	LIN	2844	2671
PEP_2875811	YGLGDRKDQAAYTMH	SEQ ID NO:35	LIN.AA	1780	1876
PEP_2875812	GLGDRKDQGGYTMHQ	SEQ ID NO:36	LIN	2824	2729
PEP_2875813	GLGDRKDQGAATMHQ	SEQ ID NO:37	LIN.AA	80	65
PEP_2875814	LGDRKDQGGYTMHQD	SEQ ID NO:38	LIN	2835	2749
PEP_2875815	LGDRKDQGGAAAMHQD	SEQ ID NO:39	LIN.AA	69	99
PEP_2875816	GDRKDQGGYTMHQDQ	SEQ ID NO:40	LIN	2647	2699
PEP_2875817	GDRKDQGGYAAHQDQ	SEQ ID NO:41	LIN.AA	2635	661
PEP_2875818	DRKDQGGYTMHQDQE	SEQ ID NO:42	LIN	2692	2788
PEP_2875819	DRKDQGGYTAAQDQE	SEQ ID NO:43	LIN.AA	2697	2585
PEP_2875820	RKDQGGYTMHQDQEG	SEQ ID NO:44	LIN	2699	2779
PEP_2875821	RKDQGGYTMAADQEG	SEQ ID NO:45	LIN.AA	2713	2791
PEP_2875822	KDQGGYTMHQDQEGD	SEQ ID NO:46	LIN	2701	2680
PEP_2875823	KDQGGYTMHAQEGD	SEQ ID NO:47	LIN.AA	2707	2712
PEP_2875824	DQGGYTMHQDQEGDT	SEQ ID NO:48	LIN	2677	2648
PEP_2875825	DQGGYTMHQAAEGDT	SEQ ID NO:49	LIN.AA	2707	2585
PEP_2875826	QGGYTMHQDQEGDTD	SEQ ID NO:50	LIN	399	789
PEP_2875827	QGGYTMHQDAAGDTD	SEQ ID NO:51	LIN.AA	427	636
PEP_2875828	GGYTMHQDQEGDTDA	SEQ ID NO:52	LIN	109	110
PEP_2875829	GGYTMHQDQAADTDA	SEQ ID NO:53	LIN.AA	106	118
PEP_2875830	GYTMHQDQEGDTDAG	SEQ ID NO:54	LIN	77	97

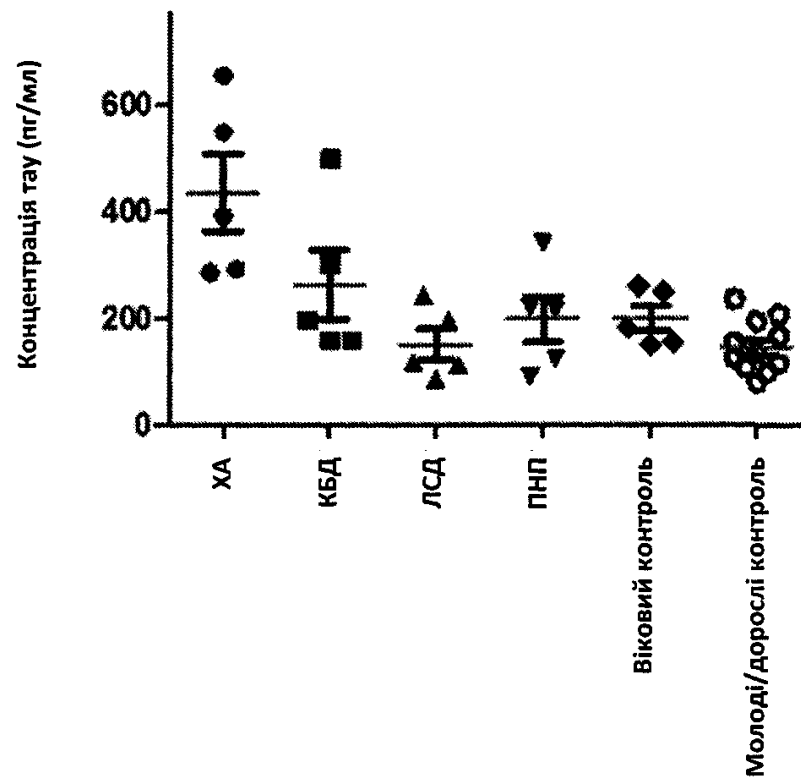
ФІГ. 9

Зв'язування гуманізованого анти-тау антитіла з тау макака-резуса



ФІГ. 10

Зв'язування гуманізованого анти-тау антитіла з тау в СМР, отриманої від людей, що страждають на різні таупатії



ФІГ. 11