



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121550** (13) **C2**

(51) МПК (2020.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 25/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

| | | | |
|---|--|--|--|
| (21) Номер заявки: | а 2017 00962 | (72) Винахідник(и): | Нереліус Шарлоте (SE), Лаудон Гана (SE), Сигвардсон Джесика (SE) |
| (22) Дата подання заявки: | 08.07.2015 | (73) Власник(и): | ЕЙСАЙ АР ЕНД ДІ МЕНЕДЖМЕНТ КО., ЛТД., 4-6-10 Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo 112- 8088, Japan (JP) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: | 25.06.2020 | (74) Представник: | Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367 |
| (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 62/022,952 | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: | WO 2007108756 A1, 27.09.2007 EP 2004688 A1, 24.12.2008 ZENJIRO SAMPEI et al. Identification and multidimensional optimization of an asymmetric bispecific IgG antibody mimicking the function of Factor VIII cofactor activity. Plos One, 2013, Vol. 8, no. 2, P. e57479 BOSWELL C. A. et al. Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics. Bioconjugate chemistry, 2010, Vol. 21, no. 12, P. 2153 – 2163 WA T. IGA et al. Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. Protein engineering design and selection, 2010, Vol. 23, no. 5, P. 385 – 392 |
| (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 10.07.2014 | | |
| (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: | US | | |
| (41) Публікація відомостей про заявку: | 10.04.2017, Бюл.№ 7 | | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: | 25.06.2020, Бюл.№ 12 | | |
| (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ | PCT/EP2015/065633, 08.07.2015 | | |

(54) АНТИТІЛО, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄ Аβ-ПРОТОФІБРИЛИ

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, яке специфічно зв'язує Аβ-протофібрил, фармацевтичної композиції та його застосування для лікування і/або профілактики хвороби Альцгеймера та інших порушень, пов'язаних з агрегацією Аβ білка.

UA 121550 C2

Галузь техніки, якої стосується винахід

Даний винахід стосується бета-амілоїдного пептиду (A β) і більш конкретно антитіл, які зв'язуються з A β -протофібрилами та їхнього застосування в терапії і/або профілактичного лікування хвороби Альцгеймера та інших порушень, пов'язаних з агрегацією A β білка. Крім того, даний винахід може стосуватися діагностики таких захворювань, а також моніторингу прогресування захворювання, шляхом застосування антитіл даного винаходу. Крім того, даний винахід може стосуватися ветеринарного застосування антитіл даного винаходу.

Рівень техніки винаходу

Хвороба Альцгеймера (ХА) стосується групи нейродегенеративних захворювань і є причиною порушення пам'яті, а також когнітивних і поведінкових порушень. Ознаки хвороби Альцгеймера містять у собі позаклітинні амілоїдні бляшки, внутрішньонейрональні нейрофібрилярні клубки, нейрональну дисфункцію і врешті-решт атрофію головного мозку. Ризик розвитку хвороби Альцгеймера підвищується з віком, і зі збільшенням кількості людей, що досягають похилого віку, зростає вплив цього захворювання на якість життя людей похилого віку. Крім того, перед суспільством постає проблема збільшення витрат на лікування цього захворювання.

Незважаючи на те, що це захворювання відоме протягом багатьох років, і було запропоновано декілька підходів до його лікування, на даний момент не існує такої ефективної терапії, яка змінює перебіг захворювання, доступної на сьогоднішній день, а тільки лікарські препарати, що у кращому випадку можуть забезпечити симптоматичне лікування. Механізм, що лежить в основі цього захворювання, був предметом багатьох досліджень. У короткому викладі, A β з певних причин починає утворювати агрегати і, пройшовши кілька проміжних форм, врешті-решт утворює нерозчинні відкладення в головному мозку у вигляді фібрил або бляшок. Раніше вважали, що самі бляшки впливають на нейрони і передані ними сигнали, але на даний момент результати великих досліджень вказують на те, що основною причиною цього захворювання і його симптомів, які спостерігаються у пацієнтів, скоріше за все, є розчинні агреговані проміжні форми A β .

Однією такою проміжною формою в каскаді перетворень агрегованих форм мономерів A β у нерозчинні фібрили A β є розчинна високомолекулярна A β -протофібрила, що вперше була описана у Walsh (1997) The Journal of Biological Chemistry (Vol. 272(35) p. 22364-72). Важлива роль A β -протофібрил у розвитку ХА була встановлена групою вчених під керівництвом Ларса Ланфельта (Lars Lannfelt) в Упсальському університеті в ході досліджень арктичної мутації, що являє собою мутацію E693G у попереднику бета-амілоїду (ПБА), що викликає посилене утворення A β -протофібрил. Було виявлено, що у членів родини з північної Швеції, які несуть цю мутацію, розвиток важкої форми хвороби Альцгеймера відбувалося на ранніх етапах життя, і відкриття цієї комбінації послужило основною ідеєю для нової терапії. Таким чином, було встановлено, що тісно пов'язані з цим захворюванням і є важливою мішенню для терапії. На основі цих досліджень A β -пептидів, що містять арктичну мутацію, Lannfelt et al. змогли in vitro отримати A β -протофібрили арктичного, а також дикого типу, в кількостях, достатніх для імунізації і наступного добору антитіл з високою афінністю до A β -протофібрилів порівняно з іншими видами A β . Приклади способів отримання A β -протофібрил і антитіл, що зв'язуються з ними, описані в Міжнародних патентних заявках WO02/03911 і WO2005/123775.

Особливе значення мало отримання мишачого моноклонального антитіла mAb158, антитіла, що зв'язується з A β -протофібрилами. Це антитіло описане в Європейському патенті EP2004688, і воно містить наступні послідовності CDR:

| | |
|----------------------------|--------------|
| VH-CDR1: SFGMH | SEQ ID NO: 1 |
| VH-CDR2: YISSGSSTIYYGDTVKG | SEQ ID NO: 2 |
| VH-CDR3: EGGYYYGRSYYTMDY | SEQ ID NO: 3 |
| VL-CDR1: RSSQSIVHSNGNTYLE | SEQ ID NO: 4 |
| VL-CDR2: KVSNRFS | SEQ ID NO: 5 |
| VL-CDR3: FQGSHVPPT | SEQ ID NO: 6 |

Висока афінність і вибірковість гуманізованого варіанта mAb158 BAN2401 робить його дуже важливим кандидатом для застосування в терапії і/або запобіганні хвороби Альцгеймера, зокрема, на даний момент проходить клінічні випробування його препарат для використання як фармацевтичного продукту. Характеристики BAN2401 описані в Європейському патенті EP2004688.

Ефективність антитіла залежить від декількох фармакокінетичних і фармакодинамічних факторів, див., наприклад, Deng et al., Expert Opin. Drug Metab. Toxicol 8(2) (2012): p. 141-160; Boswell et al., Bioconjugate Chem. 21(2010): p. 2153-2163; Konterman, Current Opinion in Biotechnology 22 (2011): p. 1-9 і Igawa et al., mAbs 3:3 (2011): p. 243-252. Серед них збільшений

час напівжиття в сироватці з підвищеним системним впливом часто забезпечує значний потенціал для покращення значущого терапевтичного ефекту. Це також надає можливість для зменшення дози, що має системне велике значення.

Опис винаходу

Даний винахід стосується антитіл, які зв'язуються з Аβ-протофібрилами та їхнього застосування в терапії і/або профілактичному лікуванні хвороби Альцгеймера та інших порушень, пов'язаних з агрегацією Аβ білка. Крім того, даний винахід може стосуватися антитіл, які застосовуються у діагностиці таких захворювань, а також їхнього застосування в моніторингу прогресування таких захворювань, а також ветеринарного застосування таких антитіл. Несподівано було встановлено, що час напівжиття в сироватці, а також вплив гуманізованого антитіла на основі mAb158, тобто BAN2401, значно збільшується, наприклад, приблизно в два або більше разів, початковим введенням однієї або декількох мутацій у визначених положеннях, тобто 17, 79 і/або 82, у варіабельному легкому ланцюгу антитіла BAN2401 (положення 17, 74 і 77 за системою нумерації Кебота), відповідно, див. також Фігуру 9, де ці положення позначені як x_1 , x_2 і x_3 . У BAN2401 амінокислота в положенні 17 (положення 17 за системою нумерації Кебота) являє собою А, амінокислота в положенні 79 (положення 74 за системою нумерації Кебота) являє собою R і амінокислота в положенні 82 (положення 77 за системою нумерації Кебота) являє собою R. Система нумерації Кебота наводиться відповідно до Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991 (NI H Publications No. 91-3242).

За необхідністю, подальше покращення антитіла даного винаходу може бути здійснене шляхом комбінування кожної з мутацій, що забезпечують збільшення часу напівжиття в сироватці, з однією або декількома сусідніми мутаціями, тобто в положеннях 13, 21, 81 і/або 84 варіабельного легкого ланцюга (положення 13, 21, 76 і 79 за системою нумерації Кебота), відповідно, див. також Фігуру 9, де ці положення позначені як y_{1-4} , в положеннях 37, 38 і/або 40 варіабельного важкого ланцюга (положення 37, 38 і 40 за системою нумерації Кебота), відповідно, див. також Фігуру 10, де ці положення позначені як z_{1-3} , для подальшого покращення імунологічної значущості, тобто низької імуногенності. Коли, порівняно з послідовністю BAN2401, x_1 є мутуванням, мутації y_1 і/або y_2 можуть бути введені, і коли x_2 і/або x_3 є мутуваннями, мутації y_3 і/або y_4 можуть бути введені. Крім того, можуть бути введені мутації z_{1-3} .

Даний винахід являє собою наступне:

[1] Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що має афінність до Аβ-протофібрилів, де це антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент має варіабельний легкий ланцюг, що відповідає послідовності SEQ ID NO: 8, де

x_1 вибраний з А, D, E і Q, або їхнього функціонального аналога;

x_2 вибраний з R, T, K, A і G, або їхнього функціонального аналога;

x_3 вибраний з R, S, C, G і N, або їхнього функціонального аналога;

y_1 вибраний з V і A;

y_2 вибраний з I і V;

y_3 вибраний з S і Q;

y_4 вибраний з E і D; і, за необхідністю, варіабельний важкий ланцюг, що відповідає послідовності SEQ ID NO: 14, де

z_1 вибраний з V і I;

z_2 вибраний з R і Q; і

z_3 вибраний з A, N і T,

за винятком комбінації $x_1=A$, $x_2=R$ і $x_3=R$.

[2] Антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за п.[1], де

x_1 вибраний з А, D, E і Q;

x_2 вибраний з R, T, K, A і G;

x_3 вибраний з R, S, C, G і N;

y_1 вибраний з V і A;

y_2 вибраний з I і V;

y_3 вибраний з S і Q;

y_4 вибраний з E і D; і

варіабельний важкий ланцюг, що відповідає послідовності SEQ ID NO: 14, де

z_1 вибраний з V і I;

z_2 вибраний з R і Q; і

z_3 вибраний з A, N і T;

за винятком комбінації $x_1=A$, $x_2=R$ і $x_3=R$.

[3] Антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за п.[1] або п.[2], де легкий ланцюг містить комбінацію мутацій, вибрану з:

x_1 і $(y_1$ і/або $y_2)$;
 x_1 і $(y_1$ і/або $y_2)$ і x_2 і $(y_3$ і/або $y_4)$;
 x_1 і $(y_1$ і/або $y_2)$ і x_2 і x_3 і $(y_3$ і/або $y_4)$;
 x_1 і $(y_1$ і/або $y_2)$ і x_3 і $(y_3$ і/або $y_4)$;
 x_2 і $(y_3$ і/або $y_4)$;
 x_2 і x_3 і $(y_3$ і/або $y_4)$; і
 x_3 і $(y_3$ і/або $y_4)$;

за винятком комбінації $x_1=A$, $x_2=R$ і $x_3=R$.

[4] Антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. [1]-[3], де варіабельний легкий ланцюг містить одну або кілька мутацій, вибраних з:

x_1 являє собою D і $(y_1$ і/або $y_2)$;
 x_1 являє собою D і $(y_1$ і/або $y_2)$, x_2 являє собою T і $(y_3$ і/або $y_4)$;
 x_1 являє собою D і $(y_1$ і/або $y_2)$, x_2 являє собою T, x_3 являє собою S і $(y_3$ і/або $y_4)$;
 x_1 являє собою D і $(y_1$ і/або $y_2)$ і x_3 являє собою S і $(y_3$ і/або $y_4)$;
 x_2 являє собою T і $(y_3$ і/або $y_4)$;
 x_2 являє собою T і x_3 являє собою S і $(y_3$ і/або $y_4)$; і
 x_3 являє собою S і $(y_3$ і/або $y_4)$;

де y_1 являє собою V або A і y_2 являє собою V або I, за винятком комбінації $y_1=V$ і $y_2=I$; y_3 являє собою S або Q і y_4 являє собою E або D, за винятком комбінації $y_3=S$ і $y_4=E$.

[5] Антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. [1]-[4], де

x_1 являє собою D;
 x_2 являє собою T;
 x_3 являє собою R;
 y_1 вибраний з V і A;
 y_2 вибраний з V і I;
 y_3 вибраний з Q і S;
 y_4 вибраний з D і E;
 z_1 являє собою V;
 z_2 являє собою R; і
 z_3 вибраний з N, T і A;

за винятком комбінації, де y_1 являє собою V, y_2 являє собою I, y_3 являє собою S, y_4 являє собою E, z_1 являє собою V, z_2 являє собою R, і z_3 являє собою A.

[6] Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п.[1], що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 12; і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16.

[7] Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п.[1], що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 9; і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15.

[8] Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п.[1], що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10; і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15.

[9] Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п.[1], що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 11; і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15.

[10] Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п.[1], що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 12; і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15.

[11] Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п.[1], що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 9; і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16.

[12] Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п.[1], що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10; і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16.

[13] Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п.[1], що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 11; і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16.

5 [14] Антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. [1]-[13], де антитіло або антигензв'язувальний фрагмент містить константну ділянку важкого ланцюга IgG.

[15] Антитіло за будь-яким з пп. [1]-[14] для застосування в терапії.

[16] Антитіло за будь-яким з пп. [1]-[14] для застосування в лікуванні і/або профілактиці хвороби Альцгеймера та інших порушень, пов'язаних з агрегацією Аβ білка.

10 [17] Антитіло за п.[16] для застосування, де такі інші порушення, пов'язані з агрегацією Аβ білка, вибрані з травматичного ушкодження головного мозку (ТУГМ), деменції з тільцями Леві (ДТЛ), синдрому Дауна (СД), бічного аміотрофічного склерозу (БАС), лобно-скроневої деменції, таупатії, системного амілоїдозу, атеросклерозу і деменції при хворобі Паркінсона (ДХП).

15 [18] Застосування антитіла за будь-яким з пп. [1]-[14] для виготовлення лікарського препарату, придатного для лікування і/або профілактики хвороби Альцгеймера та інших порушень, пов'язаних з агрегацією Аβ білка.

20 [19] Застосування за п.[18], де такі інші порушення, пов'язані з агрегацією Аβ білка, вибрані з травматичного ушкодження головного мозку (ТУГМ), деменції з тільцями Леві (ДТЛ), синдрому Дауна (СД), бічного аміотрофічного склерозу (БАС), лобно-скроневої деменції, таупатії, системного амілоїдозу, атеросклерозу і деменції при хворобі Паркінсона (ДХП).

[20] Спосіб зменшення кількості Аβ-протофібрил у суб'єкта, що включає в себе введення зазначеному суб'єкту терапевтично ефективної кількості антитіла або антигензв'язувального фрагмента за пп. [1]-[14].

25 [21] Спосіб лікування і/або профілактики хвороби Альцгеймера у суб'єкта, який має зазначене захворювання або піддається ризику його розвитку, що включає в себе введення зазначеному суб'єкту терапевтично ефективної кількості антитіла або антигензв'язувального фрагмента за пп. [1]-[14].

30 [22] Спосіб лікування і/або профілактики травматичного ушкодження головного мозку (ТУГМ), деменції з тільцями Леві (ДТЛ), синдрому Дауна (СД), бічного аміотрофічного склерозу (БАС), лобно-скроневої деменції, таупатії, системного амілоїдозу, атеросклерозу і деменції при хворобі Паркінсона (ДХП) у суб'єкта, який має зазначені захворювання або піддається ризику їхнього розвитку, що включає в себе введення зазначеному суб'єкту терапевтично ефективної кількості антитіла або антигензв'язувального фрагмента за пп. [1]-[14].

35 [23] Спосіб вимірювання кількості Аβ-протофібрил або агрегованого Аβ білка у суб'єкта, що включає в себе приведення тканини або біологічної рідини суб'єкта в контакт in vivo або in vitro з антитілом або антигензв'язувальним фрагментом за пп. [1]-[14] і вимірювання кількості антитіла або антигензв'язувального фрагмента, пов'язаного із зазначеними Аβ-протофібрилами або агрегованим Аβ білком.

40 [24] Спосіб діагностики хвороби Альцгеймера у суб'єктів, які мають дане захворювання або піддаються ризику його розвитку, що включає в себе приведення тканини або біологічної рідини суб'єкта в контакт in vivo або in vitro з антитілом або антигензв'язувальним фрагментом за пп. [1]-[14] або його фрагментом і вимірювання кількості зазначеного антитіла, пов'язаного з агрегованим Аβ білком.

45 [25] Спосіб діагностики травматичного ушкодження головного мозку (ТУГМ), деменції з тільцями Леві (ДТЛ), синдрому Дауна (СД), бічного аміотрофічного склерозу (БАС), лобно-скроневої деменції, таупатії, системного амілоїдозу, атеросклерозу і деменції при хворобі Паркінсона (ДХП) у суб'єктів, які мають зазначені захворювання або піддаються ризику їхнього розвитку, що включає в себе приведення тканини або біологічної рідини суб'єкта в контакт in vivo або in vitro з антитілом або антигензв'язувальним фрагментом за пп. [1]-[14] або його фрагментом і вимірювання кількості зазначеного антитіла, пов'язаного з агрегованим Аβ білком.

[26] Фармацевтична композиція, яка містить антитіло або антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. [1]-[14] разом з фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною і/або розріджувачами.

[27] Антитіло за будь-яким з пп. [1]-[14] для ветеринарного застосування.

55 Короткий опис креслень

На Фігурі 1 наведений аналіз зв'язування і вибірковості для Аβ-протофібрил порівняно з Аβ-мономерами для антитіл A17D, A17D/79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S порівняно з BAN2401 (контроль). Інгібування зв'язування Аβ 1-42 протофібрилами в розчині показано білими кружками і білими квадратами, а інгібування зв'язування Аβ 1-40 мономерами в розчині показано чорними кружками і чорними квадратами.

На Фігурі 2 показаний вплив (концентрація в плазмі) BAN2401 і антитіл даного винаходу у мишей, представлений у вигляді кривих концентрація-час. На графіку показаний вміст в зразках плазми крові після однократної внутрішньовенної ін'єкції BAN2401, A17D, A17D/R79T і A17D/R79T/R82S, відібраних через 0,5 год., 2 доби, 7 діб, 15 діб і 29 діб після введення, і A17D/R82S, відібраних через 0,5 год., 2 доби, 7 діб, 14 діб і 28 діб після введення.

A17D/R82S не було включено у те саме фармакокінетичне дослідження, що й інші зазначені тут антитіла, але воно було вивчено в окремому дослідженні. Проте, за винятком двох моментів часу відбору зразків плазми, для цих двох окремих досліджень використовували однакову схему експерименту. Всі зразки плазми аналізували за допомогою ІФА в той самий час, щоб уникнути розбіжностей між аналізами. Концентрація препарату в плазмі в мкг/мл показана по осі у (логарифмічна шкала), і час після введення в годинах (год.) показаний по осі х. Середньогрупові значення показані з планками погрішностей, що показують стандартні відхилення. Середні значення ППК_{0-inf} і кінцевий час напівжиття в сироватці були розраховані за допомогою некомпартментного аналізу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight), і вони наводяться в Таблиці 1.

На Фігурі 3 показаний вплив (концентрація в плазмі) BAN2401 і антитіл даного винаходу у щурів, представлений у вигляді кривих концентрація-час. На графіку показаний вміст у зразках плазми крові після однократної внутрішньовенної ін'єкції BAN2401, A17D, A17D/R79T і A17D/R79T/R82S, відібраних через 0,5 год., 2 год., 7 год., 24 год., 2 доби, 4 доби, 7 діб і 29 діб після введення. Концентрація препарату в плазмі в мкг/мл показана по осі у (логарифмічна шкала), і час після введення в годинах (год.) показаний по осі х. Середньогрупові значення показані з планками погрішностей, що показують стандартні відхилення. Середні значення ППК_{0-inf} і кінцевого часу напівжиття в сироватці були розраховані за допомогою некомпартментного аналізу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight), і вони наводяться в Таблиці 2.

На Фігурі 4 наведені дані аналізу зв'язування і вибіркості для Аβ-протофібрил порівняно з Аβ-мономерами для деімунізованих варіантів антитіла A17D/R79T (A17D/R79T_DI 1-8) порівняно з BAN2401. Інгібування зв'язування Аβ 1-42 протофібрилами в розчині показано білими кружками і білими квадратами, а інгібування зв'язування Аβ 1-40 мономерами в розчині показано чорними кружками і чорними квадратами. А) A17D/R79T_DI 1, В) A17D/R79T_DI 2, С) A17D/R79T_DI 3, D) A17D/R79T_DI 4, E) A17D/R79T_DI 5, F) A17D/R79T_DI 6, G) A17D/R79T_DI 7, H) A17D/R79T_DI 8.

На Фігурі 5 показаний вплив (концентрація в плазмі) BAN2401 і антитіл даного винаходу у мишей, представлений у вигляді кривих концентрація-час. На графіку показаний вміст у зразках плазми крові після однократної внутрішньовенної ін'єкції BAN2401, A17D/R79T і 8 деімунізованих варіантів антитіла A17D/R79T (A17D/R79T_DI 1-8), відібраних через 0,5 год., 2 доби, 7 діб, 14 діб і 28 діб після введення. Концентрація препарату в плазмі в мкг/мл показана по осі у (логарифмічна шкала), і час після введення в годинах (год.) показаний по осі х. Середньогрупові значення показані з планками погрішностей, що показують стандартні відхилення. Середні значення ППК_{0-inf} і кінцевого часу напівжиття в сироватці були розраховані за допомогою некомпартментного аналізу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight), і вони наводяться в Таблиці 6.

На Фігурі 6 показаний вплив (концентрація в плазмі) BAN2401 і мутантів у щурів, представлений у вигляді кривих концентрація-час. На графіку показаний вміст у зразках плазми крові після однократної внутрішньовенної ін'єкції BAN2401, A17D/R79T і 8 деімунізованих варіантів антитіла A17D/R79T (A17D/R79T_DI 1-8), відібраних через 0,5 год., 2 доби, 7 діб, 14 діб і 28 діб після введення. Концентрація препарату в плазмі в мкг/мл показана по осі у (логарифмічна шкала), і час після введення в годинах (год.) показаний по осі х. Середньогрупові значення показані з планками погрішностей, що показують стандартні відхилення. Середні значення ППК_{0-inf} і кінцевого часу напівжиття в сироватці були розраховані за допомогою некомпартментного аналізу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight), і вони наводяться в Таблиці 7.

На Фігурі 7 показаний вплив (концентрація в плазмі) з урахуванням дози для BAN2401, A17D/R79T_DI 3, A17D/R79T_DI 4 і A17D/R79T_DI 8 у макаки-крабоїда, представлений у вигляді кривих концентрація-час. На графіку показаний вміст антитіла BAN2401 у зразках плазми крові після однократної внутрішньовенної ін'єкції, відібраних через 5 хв, 1 год., 2 год., 8 год., 24 год., 2 доби, 4 доби, 7 діб, 14 діб, 21 добу і 28 діб після введення, і вміст антитіла A17D/R79T_DI 3, A17D/R79T_DI 4 і A17D/R79T_DI 8 після однократної внутрішньовенної ін'єкції в зразках плазми крові, відібраних через 5 хв, 1 год., 8 год., 24 год., 3 доби, 7 діб, 14 діб, 21 добу і 28 діб після введення. Антитіла даного винаходу вводили мавпі в іншому дослідженні в дозі 10 мг/кг, що

відрізнялася від дози BAN2401 (5 мг/кг). Таким чином, криві впливи були скориговані з урахуванням дози. Концентрація препарату в плазмі з урахуванням дози в мкг/мл на мг/кг введеної дози показана по осі y (логарифмічна шкала), і час після введення в годинах (год.) показаний по осі x. Середньогрупові значення показані з планками погрешностей, що показують стандартні відхилення. Середні значення ППК_{0-inf} і кінцевого часу напівжиття в сироватці були розраховані за допомогою некомпартментного аналізу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight), і вони наводяться в Таблиці 8.

На Фігурі 8 наведені амінокислотні послідовності, що стосуються даного винаходу.

На Фігурі 9 наведена таблиця, поділена на дві сторінки, з амінокислотною послідовністю варіабельного легкого ланцюга з послідовностями VL-CDRI-3, виділеними сірим кольором. BAN2401: SEQ ID NO: 7. Нові антитіла з варіабельним легким ланцюгом відповідно до даного винаходу: SEQ ID NO: 8. Конкретні приклади таких варіабельних легких ланцюгів: i): SEQ ID NO: 9; ii): SEQ ID NO: 10; iii): SEQ ID NO: 11; i iv): SEQ ID NO: 12.

На Фігурі 10 наведена таблиця, поділена на дві сторінки, з амінокислотною послідовністю варіабельного важкого ланцюга з послідовностями VL-CDRI-3, виділеними сірим кольором. BAN2401: SEQ ID NO: 13. Нові антитіла з варіабельним важким ланцюгом відповідно до даного винаходу: SEQ ID NO: 14. Конкретні приклади таких варіабельних важких ланцюгів: i): SEQ ID NO: 15; ii): SEQ ID NO: 16; iii): SEQ ID NO: 17; i iv): SEQ ID NO: 18.

На Фігурі 11 показано просте алометричне масштабування системного кліренсу (CL) BAN2401, A17D/R79T_DI 3, A17D/R79T_DI 4 і A17D/R79T_DI 8, включаючи доклінічні дані, отримані у миші, щура і макаки-крабоїда. Дані CLs різних видів нанесені на графік навпроти їхньої ваги (позначені ромбами), відповідно. Лінія регресії була екстрапольована, щоб показати CL у людини з масою тіла 70 кг. Для антитіла BAN2401 виміряний істинний системний CL позначений білим квадратом, і він відрізняється від лінії регресії, побудованої на даних CL BAN2401 у миші, щура і макаки-крабоїда. Антитіло BAN2401 показало погану лінійну кореляцію CL, що вказує на невизначеність у прогнозуванні часу його напівжиття в сироватці, на відміну від чудової лінійної кореляції CL антитіл даного винаходу.

Мутації A17D, R79T і R82S являють собою положення в антитілі BAN2401, де амінокислоти в положеннях 17, 79 і 82 мутовані у варіабельному легкому ланцюгу.

Термін "BAN2401" означає гуманізоване моноклональне антитіло мишачого антитіла mAb58, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 7, і варіабельний важкий ланцюг, з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 13. Як антитіло BAN2401, так і антитіло mAb58, а також їхні характеристики, включаючи VL-CDRI-3 і VH-CDRI-3, описані в Європейському патенті EP2004688. Антитіло BAN2401 виключається з даного винаходу.

Наступні аббревіатури означають:

BAN2401: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 13.

A17D: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 19, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 13.

A17D/R79T: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 20, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 13.

A17D/R79T/R82S: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 21, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 13.

A17D/R82S: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 22, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 13.

A17D/R79T_DI 1: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 9, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15.

A17D/R79T_DI 2: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15.

A17D/R79T_DI 3: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 11, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15.

A17D/R79T_DI 4: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 12, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15.

5 A17D/R79T_DI 5: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 9, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16.

A17D/R79T_DI 6: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16.

10 A17D/R79T_DI 7: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 11, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16.

15 A17D/R79T_DI 8: Антитіло, що включає в себе варіабельний легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 12, і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16.

20 Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до даного винаходу містить у варіабельному легкому ланцюгу в положенні 17 (положення 17 за системою нумерації Кебота) амінокислоту A, D, E, Q або її функціональний аналог, у положенні 79 (положення 74 за системою нумерації Кебота) амінокислоту R, T, K, A, G або її функціональний аналог і в положенні 82 (положення 77 за системою нумерації Кебота) амінокислоту R, S, C, G, N або її функціональний аналог. Функціональний аналог являє собою амінокислоту, що забезпечує нижче значення рі антитіла порівняно з A (положення 17), відповідно, R (положення 79 і 82) без негативного впливу на зв'язування з антигеном.

Амінокислотні послідовності в даному винаході представлені в такий спосіб:

25 SEQ ID NO: 1: VH-CDR1 варіабельного важкого ланцюга антитіла BAN2401.

SEQ ID NO: 2: VH-CDR2 варіабельного важкого ланцюга антитіла BAN2401.

SEQ ID NO: 3: VH-CDR3 варіабельного важкого ланцюга антитіла BAN2401.

SEQ ID NO: 4: VL-CDR1 варіабельного легкого ланцюга антитіла BAN2401.

SEQ ID NO: 5: VL-CDR2 варіабельного легкого ланцюга антитіла BAN2401.

30 SEQ ID NO: 6: VL-CDR3 варіабельного легкого ланцюга антитіла BAN2401.

SEQ ID NO: 7: варіабельний легкий ланцюг BAN2401.

SEQ ID NO: 8: загальна послідовність варіабельного легкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

35 SEQ ID NO: 9: конкретна послідовність варіабельного легкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

SEQ ID NO: 10: конкретна послідовність варіабельного легкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

SEQ ID NO: 11: конкретна послідовність варіабельного легкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

40 SEQ ID NO: 12: конкретна послідовність варіабельного легкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

SEQ ID NO: 13: варіабельний важкий ланцюг BAN2401.

SEQ ID NO: 14: загальна послідовність варіабельного важкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

45 SEQ ID NO: 15: конкретна послідовність варіабельного важкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

SEQ ID NO: 16: конкретна послідовність варіабельного важкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

50 SEQ ID NO: 17: конкретна послідовність варіабельного важкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

SEQ ID NO: 18: конкретна послідовність варіабельного важкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

SEQ ID NO: 19: конкретна послідовність варіабельного легкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

55 SEQ ID NO: 20: конкретна послідовність варіабельного легкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

SEQ ID NO: 21: конкретна послідовність варіабельного легкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

60 SEQ ID NO: 22: конкретна послідовність варіабельного легкого ланцюга в антитілах даного винаходу.

SEQ ID NO: 23: амінокислотна послідовність константної області IgG людини, що міститься в антитілах даного винаходу.

SEQ ID NO: 24: амінокислотна послідовність константної області к ланцюга людини, що міститься в антитілах даного винаходу.

5 Варіабельний легкий ланцюг (SEQ I D NO: 7) антитіла BAN2401 і антитіл даного винаходу містить три послідовності CDR (VL-CDRI-3):

VL-CDR1: RSSQSIVHSNGNTYLE SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: KVSNRFS SEQ ID NO: 5

VL-CDR3: FQGSHVPPT SEQ ID NO: 6

і варіабельний важкий ланцюг (SEQ I D NO: 13) антитіла BAN2401 і антитіл даного винаходу містить три послідовності CDR (VH-CDRI-3):

VH-CDR1: SFGMH SEQ ID NO: 1

VH-CDR2: YISSGSSTIYYGDTVKG SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: EGGYYYGRSYYTMDY SEQ ID NO: 3

10 Відповідно до одного аспекту даного винаходу запропоновані антитіла, які зв'язуються з Аβ-протофібрилами і які мають наступні комбінації послідовностей CDR:

| | |
|----------------------------|--------------|
| VH-CDR1: SFGMH | SEQ ID NO: 1 |
| VH-CDR2: YISSGSSTIYYGDTVKG | SEQ ID NO: 2 |
| VH-CDR3: EGGYYYGRSYYTMDY | SEQ ID NO: 3 |
| VL-CDR1: RSSQSIVHSNGNTYLE | SEQ ID NO: 4 |
| VL-CDR2: KVSNRFS | SEQ ID NO: 5 |
| VL-CDR3: FQGSHVPPT | SEQ ID NO: 6 |

15 і які містять варіабельний легкий ланцюг з послідовністю SEQ I D NO: 8, де x_1 являє собою A, D, E, Q або їхній функціональний аналог, x_2 являє собою R, T, K, A, G або їхній функціональний аналог, і x_3 являє собою R, S, C, G, N або їхній функціональний аналог, за винятком комбінації $x_1=A$, $x_2=R$ і $x_3=R$.

Функціональний аналог являє собою амінокислоту, що забезпечує нижче значення рі антитіла порівняно з A (x_1), відповідно, R (x_2 і x_3) без негативного впливу на зв'язування з антигеном.

20 Варіабельний важкий ланцюг має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ I D NO: 8, що містить z_1 , z_2 і z_3 у будь-якій комбінації, де

z_1 вибраний з V і I;

z_2 вибраний з R і Q; і

z_3 вибраний з A, N і T;

25 за винятком комбінації $z_1=V$, $z_2=R$ і $z_3=A$.

30 Слід зазначити, що на основі цього принципу визначення функціонального аналога конкретних амінокислот, зазначених вище, для кожного з положень легко здійснюється фахівцем у даній галузі техніки, тому що способи введення амінокислоти в конкретне положення відповідно до даного винаходу, а також способи перевірки отриманого продукту, наприклад, на наявність афінності до Аβ-протофібрил та інших важливих характеристик, є розкритими, див. нижче.

Таким чином, в одному аспекті даний винахід стосується антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, що має афінність до Аβ-протофібрил, де це антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент має варіабельний легкий ланцюг з послідовністю SEQ I D NO: 8, де x_1 вибраний з A, D, E і Q або їхнього функціонального аналога;

x_2 вибраний з R, T, K, A і G, або їхнього функціонального аналога;

x_3 вибраний з R, S, C, G і N, або їхнього функціонального аналога;

y_1 вибраний з V і A;

y_2 вибраний з I і V;

40 y_3 вибраний з S і Q;

y_4 вибраний з E і D; і, за необхідністю, варіабельний важкий ланцюг, що відповідає послідовності SEQ ID NO: 14, де

z_1 вибраний з V і I;

z_2 вибраний з R і Q; і

45 z_3 вибраний з A, N і T,

за винятком комбінації $x_1=A$, $x_2=R$ і $x_3=R$.

В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, де

- x_1 вибраний з A, D, E і Q;
 x_2 вибраний з R, T, K, A і G;
 x_3 вибраний з R, S, C, G і N;
 y_1 вибраний з V і A;
5 y_2 вибраний з I і V;
 y_3 вибраний з S і Q;
 y_4 вибраний з E і D; і
 варіабельний важкий ланцюг, що відповідає послідовності SEQ ID NO: 14, де
 z_1 вибраний з V і I;
10 z_2 вибраний з R і Q; і
 z_3 вибраний з A, N і T;
 за винятком комбінації $x_1=A$, $x_2=R$ і $x_3=R$.
 В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його
 антигензв'язувальний фрагмент, де легкий ланцюг містить комбінацію мутацій, вибрану з:
15 x_1 і (y_1 і/або y_2);
 x_1 і (y_1 і/або y_2) і x_2 і (y_3 і/або y_4);
 x_1 і (y_1 і/або y_2) і x_2 і x_3 і (y_3 і/або y_4);
 x_1 і (y_1 і/або y_2) і x_3 і (y_3 і/або y_4);
 x_2 (y_3 і/або y_4);
20 x_2 і x_3 і (y_3 і/або y_4); і
 x_3 і (y_3 і/або y_4);
 за винятком комбінації $x_1=A$, $x_2=R$ і $x_3=R$.
 В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його
 антигензв'язувальний фрагмент, де варіабельний легкий ланцюг містить одну або декілька
25 мутацій, вибраних з:
 x_1 являє собою D і (y_1 і/або y_2);
 x_1 являє собою D і (y_1 і/або y_2), x_2 являє собою T і (y_3 і/або y_4);
 x_1 являє собою D і (y_1 і/або y_2), x_2 являє собою T, x_3 являє собою S і (y_3 і/або y_4);
 x_1 являє собою D і (y_1 і/або y_2) і x_3 являє собою S і (y_3 і/або y_4);
30 x_2 являє собою T (y_3 і/або y_4);
 x_2 являє собою T і x_3 являє собою S і (y_3 і/або y_4); і
 x_3 являє собою S і (y_3 і/або y_4);
 де y_1 являє собою V або A і y_2 являє собою V або I, за винятком комбінації $y_1=V$ і $y_2=I$; y_3
 являє собою S або Q і y_4 являє собою E або D, за винятком комбінації $y_3=S$ і $y_4=E$.
35 В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його
 антигензв'язувальний фрагмент, де y_1 являє собою A, і y_2 являє собою V, y_3 являє собою Q і y_4
 являє собою D.
 В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його
 антигензв'язувальний фрагмент, де
40 x_1 являє собою D;
 x_2 являє собою T;
 x_3 являє собою R;
 y_1 вибраний з V і A;
 y_2 вибраний з V і I;
45 y_3 вибраний з Q і S;
 y_4 вибраний з D і E;
 z_1 являє собою V;
 z_2 являє собою R; і
 z_3 вибраний з N, T і A;
50 за винятком комбінації, де y_1 являє собою V, y_2 являє собою I, y_3 являє собою S, y_4 являє
 собою E, z_1 являє собою V, z_2 являє собою R, і z_3 являє собою A.
 В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його
 антигензв'язувальний фрагмент, де
55 x_1 являє собою D;
 x_2 являє собою T;
 x_3 являє собою R;
 y_1 являє собою V;
 y_2 являє собою V;
 y_3 являє собою Q;
60 y_4 являє собою E;

| | |
|----|---|
| | z_1 являє собою V; z_2 являє собою R; i z_3 являє собою N. В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його |
| 5 | антигензв'язувальний фрагмент, де x_1 являє собою D; x_2 являє собою T; x_3 являє собою R; y_1 являє собою V; 10 y_2 являє собою V; y_3 являє собою S; y_4 являє собою D; z_1 являє собою V; z_2 являє собою R; i 15 z_3 являє собою N. В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його |
| | антигензв'язувальний фрагмент, де x_1 являє собою D; x_2 являє собою T; 20 x_3 являє собою R; y_1 являє собою A; y_2 являє собою I; y_3 являє собою Q; y_4 являє собою E; 25 z_1 являє собою V; z_2 являє собою R; i z_3 являє собою N. В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його |
| 30 | антигензв'язувальний фрагмент, де x_1 являє собою D; x_2 являє собою T; x_3 являє собою R; y_1 являє собою A; y_2 являє собою I; 35 y_3 являє собою S; y_4 являє собою D; z_1 являє собою V; z_2 являє собою R; i z_3 являє собою N. В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його |
| 40 | антигензв'язувальний фрагмент, де x_1 являє собою D; x_2 являє собою T; x_3 являє собою R; 45 y_1 являє собою V; y_2 являє собою V; y_3 являє собою Q; y_4 являє собою E; z_1 являє собою V; 50 z_2 являє собою R; i z_3 являє собою T. В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його |
| | антигензв'язувальний фрагмент, де x_1 являє собою D; 55 x_2 являє собою T; x_3 являє собою R; y_1 являє собою V; y_2 являє собою V; y_3 являє собою S; 60 y_4 являє собою D; |

z_1 являє собою V;
 z_2 являє собою R; і
 z_3 являє собою T.

В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, де

x_1 являє собою D;
 x_2 являє собою T;
 x_3 являє собою R;
 y_1 являє собою A;
 y_2 являє собою I;
 y_3 являє собою Q;
 y_4 являє собою E;
 z_1 являє собою V;
 z_2 являє собою R; і
 z_3 являє собою T.

В одному варіанті здійснення цього аспекту запропоноване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, де

x_1 являє собою D;
 x_2 являє собою T;
 x_3 являє собою R;
 y_1 являє собою A;
 y_2 являє собою I;
 y_3 являє собою S;
 y_4 являє собою D;
 z_1 являє собою V;
 z_2 являє собою R; і
 z_3 являє собою T.

Відповідно до одного аспекту даного винаходу кожна мутація x_1 - x_3 комбінується з однією або декількома додатковими мутаціями y_1 - y_4 :

коли x_1 не є A, вводяться мутації y_1 і/або y_2 ;
 коли x_2 не є R і/або x_3 не є R, вводяться мутації y_3 і/або y_4 ;

що призводить до утворення варіабельних легких ланцюгів, які містять наступні комбінації мутантів порівняно з SEQ ID NO: 7:

x_1 і (y_1 і/або y_2); або
 x_1 і (y_1 і/або y_2) і x_2 і (y_3 і/або y_4); або
 x_1 і (y_1 і/або y_2) і x_2 і x_3 і (y_3 і/або y_4); або
 x_1 і (y_1 і/або y_2) і x_3 і (y_3 і/або y_4); або
 x_2 (y_3 і/або y_4); або
 x_2 і x_3 і (y_3 і/або y_4); або
 x_3 і (y_3 і/або y_4);

де параметри x і y є такими, як визначено вище.

В одному варіанті здійснення винаходу легкий ланцюг (SEQ ID NO: 8) антитіла або його антигензв'язувального фрагмента відповідно до даного винаходу містить тільки одну або декілька з мутацій x_1 - x_3 у варіабельного легкого ланцюга (з використанням N-кінцевої нумерації): A17D (x_1), R79T (x_2) і R82S (x_3):

A17D; або
 A17D і R79T; або
 A17D і R79T і R82S; або
 A17D і R82S; або
 R79T; або
 R79T і R82S; або
 R82S;

де y_1 являє собою V, y_2 являє собою I, y_3 являє собою S, і y_4 являє собою E (без змін порівняно з SEQ ID NO: 7).

Відповідно до іншого варіанта здійснення винаходу мутації y_1 - y_4 вводяться, забезпечуючи будь-яку з наступних комбінацій:

A17D і (y_1 і/або y_2);
 A17D і (y_1 і/або y_2) і R79T і (y_3 і/або y_4);
 A17D і (y_1 і/або y_2) і R79T і R82S і (y_3 і/або y_4);
 A17D і (y_1 і/або y_2) і R82S і (y_3 і/або y_4);

SEQ ID NO: 12; і варіабельний важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлена в SEQ ID NO: 16.

В одному варіанті здійснення винаходу антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до даного винаходу містить константну ділянку важкого ланцюга, вибрану з групи, що складається з константних ділянок IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA або IgE або будь-якого їхнього алельного варіанта, як описано в роботі Kabat et al. (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), включеної у даний винахід шляхом посилання. Кожна з таких послідовностей може бути використана в даному винаході. У більш переважному варіанті здійснення константна ділянка важкого ланцюга антитіла є ділянкою IgG1. Амінокислотна послідовність константної ділянки IgG1 людини відома з рівня техніки і представлена в SEQ ID NO: 23.

В одному варіанті здійснення винаходу антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до даного винаходу містить константну ділянку легкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з константних ділянок κ - і λ -ланцюга або будь-якого їхнього алельного варіанта, як описано в роботі Kabat et al. (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), включеної у даний винахід шляхом посилання. Будь-яка з таких послідовностей може бути використана в даному винаході. У більш переважному варіанті здійснення константна ділянка легкого ланцюга антитіла є ділянкою κ -ланцюга. Амінокислотна послідовність константної ділянки κ -ланцюга людини відома з рівня техніки і представлена в SEQ ID NO: 24.

В одному варіанті здійснення винаходу антигензв'язувальний фрагмент даного винаходу являє собою Fab-фрагмент і F(ab')₂-фрагмент або одноклановий Fv-фрагмент.

Антитіла або антигензв'язувальні фрагменти даного винаходу можуть містити будь-яку комбінацію варіабельних легких і важких ланцюгів, описаних вище.

Відповідно до одного аспекту даний винахід стосується покращених антитіл або антигензв'язувальних фрагментів з високою афінністю до А β -протофібрил для застосування в терапії, наприклад, шляхом введення одного або декількох антитіл або антигензв'язувальних фрагментів даного винаходу пацієнту, що має ризик розвитку хвороби Альцгеймера та інших порушень, пов'язаних з агрегацією А β білка, таких як травматичне ушкодження головного мозку (ТУГМ), деменція з тільцями Леві (ДТЛ), синдром Дауна (СД), бічний аміотрофічний склероз (БАС), лобно-скронева деменція, таупатія, системний амілоїдоз, атеросклероз і деменція при хворобі Паркінсона (ДХП). Придатна доза може варіювати в широкому діапазоні, наприклад, від 0,01 до 100 мг/кг/доза, залежно від медичних показань і стану пацієнта, способу введення, наприклад, внутрішньовенної, підшкірної ін'єкції або шляхом місцевого введення, а також вибраної частоти введення, наприклад, разової дози, щодобового, щотижневого, щоквартального або навіть менш частого введення.

В одному аспекті даний винахід стосується антитіла або його антигензв'язувального фрагмента для застосування в терапії.

В одному аспекті даний винахід стосується антитіла або його антигензв'язувального фрагмента для застосування в терапії і/або профілактиці хвороби Альцгеймера та інших порушень, пов'язаних з агрегацією А β білка. Як правило, такі порушення можуть бути вибрані з травматичного ушкодження головного мозку (ТУГМ), деменції з тільцями Леві (ДТЛ), синдрому Дауна (СД), бічного аміотрофічного склерозу (БАС), лобно-скроневої деменції, таупатії, системного амілоїдозу, атеросклерозу і деменції при хворобі Паркінсона (ДХП).

В одному аспекті даний винахід стосується застосування антитіла або його антигензв'язувального фрагмента для виготовлення лікарського препарату, придатного для лікування і/або профілактики хвороби Альцгеймера та інших порушень, пов'язаних з агрегацією А β білка. Як правило, такі порушення можуть бути вибрані з травматичного ушкодження головного мозку (ТУГМ), деменції з тільцями Леві (ДТЛ), синдрому Дауна (СД), бічного аміотрофічного склерозу (БАС), лобно-скроневої деменції, таупатії, системного амілоїдозу, атеросклерозу і деменції при хворобі Паркінсона (ДХП).

В одному аспекті даний винахід стосується способу зменшення кількості А β -протофібрил у суб'єктів, що включає в себе введення зазначеному суб'єкту терапевтично ефективної кількості антитіла або його антигензв'язувального фрагмента даного винаходу.

В одному аспекті даний винахід стосується способу лікування і/або профілактики хвороби Альцгеймера та інших порушень, пов'язаних з агрегацією А β білка, у суб'єкта, що має ризик розвитку цього захворювання, який включає в себе введення зазначеному суб'єкту терапевтично ефективної кількості антитіла або його антигензв'язувального фрагмента даного винаходу. Як правило, такі порушення можуть бути вибрані з травматичного ушкодження

головного мозку (ТУГМ), деменції з тільцями Леві (ДТЛ), синдрому Дауна (СД), бічного аміотрофічного склерозу (БАС), лобно-скроневої деменції, таупатії, системного амілоїдозу, атеросклерозу і деменції при хворобі Паркінсона (ДХП).

Термін "суб'єкт", як правило, стосується ссавця, такого як людина. Інші ссавці являють собою таких ссавців, відносно яких буде застосовуватися ветеринарне застосування/лікування/профілактика.

В одному аспекті даний винахід може стосуватися способу вимірювання кількості Аβ-протофібрил і/або агрегованого Аβ білка у суб'єкта, що включає в себе приведення тканини або біологічної рідини суб'єкта в контакт *in vivo* або *in vitro* з міченим антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом даного винаходу і вимірювання кількості антитіл або антигензв'язувальних фрагментів, пов'язаних із зазначеними Аβ-протофібрилами і/або агрегованим Аβ білком. З метою виявлення антитіла або антигензв'язувальні фрагменти можуть бути мічені радіоактивними лігандом, таким як, але без обмежень, радіоізотопи ^{131}I , C^{11} , C^{14} , H^3 , F^{18} або галій⁶⁸.

В одному аспекті даний винахід може стосуватися способу діагностики хвороби Альцгеймера та інших порушень, пов'язаних з агрегацією Аβ білка, таких як травматичне ушкодження головного мозку (ТУГМ), деменція з тільцями Леві (ДТЛ), синдром Дауна (СД), бічний аміотрофічний склероз (БАС), лобно-скронева деменція, таупатія, системний амілоїдоз, атеросклероз і деменція при хворобі Паркінсона (ДХП), у суб'єктів, що мають ризик розвитку цього захворювання, який включає в себе приведення тканини або біологічної рідини суб'єкта в контакт *in vivo* або *in vitro* з антитілом даного винаходу або його антигензв'язувальним фрагментом і вимірювання кількості або антитіла антигензв'язувального фрагмента, пов'язаного з агрегованим Аβ білком. Як правило, зазначені інші порушення, пов'язані з агрегацією Аβ білка, можуть бути вибрані з травматичного ушкодження головного мозку (ТУГМ), деменції з тільцями Леві (ДТЛ), синдрому Дауна (СД), бічного аміотрофічного склерозу (БАС), лобно-скроневої деменції, таупатії, системного амілоїдозу, атеросклерозу і деменції при хворобі Паркінсона (ДХП). Як правило, біологічну рідину або тканину суб'єкта аналізують *in vivo* або *in vitro* (у зразку, отриманому від пацієнта) шляхом приведення в контакт із препаратом одного або декількох антитіл або антигензв'язувальних фрагментів даного винаходу і вимірюють кількість антитіл або антигензв'язувальних фрагментів, пов'язаних з Аβ-протофібрилами. Кількісне визначення протофібрил може застосовуватися в діагностиці вищезазначених захворювань, моніторингу ефективності різних способів лікування, а також при розробці нових лікарських засобів. За необхідністю антитіла або їхні антигензв'язувальні фрагменти в такому препараті можуть бути міченим агентом, що може бути виявлений і виміряний за допомогою кожного з методів, відомих з рівня техніки, наприклад, аналізу за допомогою ІФА, Віасоре і/або візуалізації за допомогою ОФЕКТ, ПЕТ, МРТ. З метою виявлення антитіла або антигензв'язувальні фрагменти можуть бути мічені радіоактивними лігандом, таким як, але без обмежень, радіоізотопи ^{131}I , C^{11} , C^{14} , H^3 , F^{18} або галій⁶⁸.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу отримують фармацевтичну композицію, що містить ефективну кількість одного або декількох антитіл або їхніх антигензв'язувальних фрагментів даного винаходу. Лікарська композиція, що містить антитіло даного винаходу, на додаток до ефективної кількості цього антитіла, може містити інші компоненти, відомі для застосування в таких препаратах, наприклад, буфери, компоненти для консервації і стабільності.

В іншому аспекті даний винахід може стосуватися антитіла для ветеринарного застосування. Як правило, зазначене ветеринарне застосування містить у собі лікування і/або профілактику порушень, пов'язаних з агрегацією Аβ білка.

В іншому аспекті даний винахід може стосуватися терапії із застосуванням антитіл даного винаходу в комбінації із симптоматичним лікуванням, таким як інгібітори ацетилхолінестерази, антагоністи NMDA та інгібітори 5HT6.

Комбінація з іншими симптом-модифікуючими терапіями, такими як інгібітори γ-секретази (GSI), модулятори γ-секретази (GSM), інгібітори β-секретази (BACE), модулятори BACE, вакцини, інші антитіла, лікарські препарати, спрямовані на тау-білки або нейрозапальні процеси, антигіпертензивні препарати тощо забезпечує додаткові можливості для ефективної терапії.

Комбінація з харчовими продуктами може забезпечувати додаткові можливості для ефективної терапії.

В одному аспекті даний винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить антитіло даного винаходу разом з фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною і/або розріджувачами, зазначена композиція також може містити додатковий терапевтичний агент. Як правило, зазначений додатковий терапевтичний агент може бути вибраний з інгібіторів

ацетилхолінестерази, антагоністів NMDA, інгібіторів 5HT₆, інгібіторів GSI, GSM, BACE, вакцин, інших антитіл, лікарських препаратів, спрямованих на тау-білки або нейрозапальні процеси, антигіпертензивних препаратів і харчових продуктів. Композиція може бути виготовлена у вигляді однієї або декількох доз.

5 Даний винахід буде проілюстровано декількома необмежувальними прикладами:

Приклад 1. Отримання антитіл і використання способи

Отримання еталонного антитіла

Еталонне антитіло BAN2401 отримували відповідно до способів, раніше описаних в Європейському патенті EP2004688.

10 Отримання антитіл даного винаходу

Антитіла даного винаходу отримували за допомогою транзйентного і/або стабільного синтезу в клітинах яєчника китайського хом'ячка (CHO) з використанням експресійних систем CHOK1SV GS і CHOK1SV GS-KO Xceed™ (Lonza), відповідно. Наступні мутанти отримували за допомогою транзйентної трансфекції з використанням експресійної системи CHOK1SV GS-KO Xceed™: A17D, A17D/R79T і A17D/R79T/R82S. Наступні мутанти отримували за допомогою як транзйентної, так і стабільної трансфекції з використанням експресійної системи CHOK1SV GS-KO Xceed™: A17D/R79T_DI 1, A17D/R79T_DI 2, A17D/R79T_DI 3, A17D/R79T_DI 4, A17D/R79T_DI 5, A17D/R79T_DI 6, A17D/R79T_DI 7 і A17D/R79T_DI 8. Мутант A17D/R82S отримували за допомогою стабільної трансфекції з використанням експресійної системи CHOK1SV GS.

20 Послідовності ділянок, що кодують легкий і важкий ланцюг цих мутантів, синтезували з використанням стандартних способів.

Для транзйентної трансфекції в експресійній системі CHOK1SV GS-KO Xceed™, ділянки, що кодують легкий ланцюг, субклонували у вектор рXC-17.4, а ділянки, що кодують важкий ланцюг - у вектор рXC-18.4. Експресувальні культури збирали на 6 добу після трансфекції та освітлювали центрифугуванням і стерильною фільтрацією. Освітлені супернатанти клітинних культур очищали за допомогою хроматографії на білку А. Елюйоване антитіло вміщували у ФСБ (рН 7,4). Продукти додатково очищували за допомогою препаративної ексклюзійної хроматографії для видалення агрегатів. Зібраний пік мономера потім аналізували за допомогою аналітичної ексклюзійної хроматографії, і визначали, що вміст агрегатів становить менше 2% для всіх продуктів.

30 Стабільну експресію в системі CHOK1SV GS-KO Xceed™ здійснювали в основному відповідно до рекомендацій виробника. В короткому викладі, два вектори, що містять легкий і важкий ланцюги (рXC-17.4 і рXC-18.4), лігували в один двогенний вектор, який містить обидва гени. Клітини CHOK1SV GS-KO трансфікували за допомогою електропорації лінеаризованим двогенним вектором. Скринінг клонів і скринінг продуктивності мертвих культур проводили за допомогою ІФА. Напрацювання продукту здійснювали в середовищі CD-CHO, доповненому 15 % поживної добавки А і 15 % поживної добавки В (Life Technologies). Супернатанти збирали за допомогою центрифугування і стерильної фільтрації. Освітлені супернатанти клітинних культур очищали за допомогою хроматографії на білку G і заміняли буфер на ФСБ Дульбекко (Gibco).

40 Для стабільної трансфекції з використанням експресійної системи CHOK1SV GS (Lonza) ген важкого ланцюга лігували у вектор рEE6.4, а ген легкого ланцюга - у вектор рEE12.4. Ці два вектори лігували для отримання двогенного вектора. Клітини CHOK1SV трансфікували за допомогою електропорації лінеаризованим двогенним вектором. В основному трансфекцію здійснювали відповідно до рекомендацій виробника. Скринінг клонів і скринінг продуктивності мертвих культур проводили за допомогою ІФА. Напрацювання продукту здійснювали в середовищі CD-CHO, доповненої 15 % поживної добавки А і 15 % поживної добавки В (Life Technologies). Супернатанти збирали за допомогою центрифугування і стерильної фільтрації. Освітлені супернатанти клітинних культур очищали за допомогою хроматографії на білку G і заміняли буфер на ФСБ Дульбекко (Gibco). Аналіз якості продукту за допомогою ексклюзійної ВЕРХ і ДСН-ПААГ здійснювали з використанням очищеного матеріалу всіх отриманих мутантів.

50 Аналіз зв'язування з мішенню шляхом інгібувального ІФА

Характеристики зв'язування з Аβ-протофібрилами і Аβ-мономерами для антитіл даного винаходу порівняно з антитілом BAN2401 аналізували з використанням інгібувального ІФА, в якому антитіла попередньо інкубували в розчині з Аβ-протофібрилами або Аβ-мономерами, а потім переносили в покриті Аβ ІФА-планшети, як описано в Tucker et. al. J Alzheimers Dis. 2015; 43(2): 575-88. doi: 10.3233/JAD-140741. PubMed PMID: 25096615 і наведених там посиланнях.

Фармакокінетичні дослідження на мишах дикого типу

8-10-тижневих самиць мишей лінії C57BL/6 розподіляли за групами і однократно вводили їм внутрішньовенні ін'єкції антитіла BAN2401 або антитіл даного винаходу в кількості 10 мг/кг. Зразки плазми у всіх тварин відбирали в моменти часу, що знаходяться в діапазоні від 30

хвилин до 29 діб після ін'єкції, і використовували їх для вимірювання концентрації антитіл і наступного розрахунку фармакокінетичних (ФК) параметрів. Мишей умертвляли при останньому заборі плазми.

Фармакокінетичні дослідження на щурах

8-тижневих самиць щурів лінії Спрег-Доулі розподіляли за групами і однократно вводили їм внутрішньовенні ін'єкції антитіла BAN2401 або антитіл даного винаходу в кількості 10 мг/кг. Зразки плазми у всіх тварин відбирали в моменти часу, що знаходяться в діапазоні від 30 хвилин до 29 доби після ін'єкції, і використовували їх для вимірювання концентрації антитіл і наступного розрахунку ФК параметрів. Щурів умертвляли при останньому заборі плазми.

Фармакокінетичні дослідження на мавпах

Самців маками-крабоїда розподіляли за групами (N=3) і однократно вводили їм внутрішньовенні інфузії антитіла BAN2401 у кількості 5 мг/кг або антитіл даного винаходу в кількості 10 мг/кг. Зразки сироватки у всіх тварин відбирали в моменти часу, що знаходяться в діапазоні від 5 хвилин до 28 діб після ін'єкції, і використовували їх для вимірювання концентрації антитіл. Рівень антитіла BAN2401 і антитіл даного винаходу в зразках сироватки визначали за допомогою ІФА. Біотинільовані Аβ 1-42 протофібрили додавали до іммобілізованого на мікропланшеті авідину для покриття. Після блокування в ямки додавали зразки сироватки мавп. Після відмивання від будь-яких незв'язаних речовин у ямки додавали мічений лужною фосфатазою (ЛФ) козячий анти-людський IgG. Після промивання для видалення будь-яких незв'язаних реагентів у ямки додавали субстрат для ЛФ п-нітрофенілфосфат. Реакцію зупиняли розчином гідроксиду натрію і вимірювали поглинання при довжині хвилі 405 нм і 492 нм. Значення поглинання при довжині хвилі 492 нм віднімали зі значення поглинання при довжині хвилі 405 нм. Значення переводили в концентрацію за допомогою каліброваної кривої і використовували для наступних розрахунків ФК параметрів.

Прямий ІФА для вимірювання анти-Аβ антитіл

Рівні антитіла BAN2401 і антитіл даного винаходу в культуральних середовищах, очищених продуктах антитіл і зразках плазми, відібраних у мишей і щурів у ФК дослідженнях, вимірювали за допомогою прямого ІФА для визначення анти-Аβ антитіл. Зразки серійно розводили і інкубували в мікротитраційному планшеті з ямками, покритими Аβ 1-40, щоб забезпечити зв'язування антитіла BAN2401 і антитіл даного винаходу. Кон'югований з пероксидазою хрому козячий анти-людський IgG використовували для виявлення антитіл і додавали субстрат для пероксидази хрому ТМБ. Реакцію зупиняли шляхом додавання 2М H₂SO₄, що призводило до утворення жовтого забарвлення, яке вимірювали при довжині хвилі 450 нм. Цей спосіб використовували для кількісного визначення, де значення ОП₄₅₀ переводили в концентрацію за допомогою каліброваної кривої.

Обчислення ФК параметрів за допомогою некомпартментного аналізу

Окремі розрахунки кінцевого часу напівжиття в сироватці виконували з використанням некомпартментної моделі за допомогою програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight). Розрахунки площі під кривою (ППК_{0-inf}) виконували за допомогою програми Phoenix WinNonlin з використанням лінійно-логарифмічного методу. Середньогрупові значення і стандартні відхилення значень ППК і кінцевого часу напівжиття в сироватці розраховували з використанням програми GraphPad Prism (v 6.04).

Статистичний аналіз

Статистичний аналіз середньогрупових значень окремо визначених значень кінцевого часу напівжиття в сироватці і ППК виконували з використанням програми GraphPad Prism (v. 6.04). У цих дослідженнях використовували однофакторний дисперсійний аналіз з наступним застосуванням апостеріорного критерію множинного порівняння Бонфероні. Аналіз проводили з рівнями значущості *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 і ****P<0,0001.

Приклад 2. Характеристика цільового зв'язування

Зв'язування з Аβ-протофібрилами зберігається у A17D, A17D/R79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S порівняно з BAN2401

Профілі цільового зв'язування антитіл даного винаходу аналізували порівняно з BAN2401 (контроль) за допомогою інгібувального ІФА, як описано в Прикладі 1 (інгібувальний ІФА). Результати представлені на Фігурі 1, де показаний аналіз зв'язування і вибіркості для Аβ-протофібрил порівняно з Аβ-мономерами для антитіл A17D, A17D/R79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S порівняно з BAN2401. Ці результати показують, що зв'язування і вибіркості зв'язування з Аβ-протофібрилами порівняно зі зв'язуванням Аβ-мономером зберігається у антитіл даного винаходу (A17D, A17D/R79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S).

Приклад 3. Фармакокінетичні профілі антитіл у мишей

Фармакокінетичне дослідження антитіл BAN2401, A17D, A17D/R79T, A17D/R82S,

A17D/R79T/R82S у мишей дикого типу

Для вивчення фармакокінетичного профілю антитіл даного винаходу у мишей дикого типу, 8-10-тижневим самицям мишей лінії C57BL/6 однократно вводили у вигляді внутрішньовенної ін'єкції 10 мг/кг антитіл BAN2401 (N=8), A17D (N=7), A17D/R79T (N=6), A17D/R82S (N=8) або A17D/R79T/R82S (N=7). У тварин брали кров через 0,5 год., 2 доби, 7 діб, 14 або 15 діб і 28 або 29 діб після введення, і рівні BAN2401 і антитіл даного винаходу аналізували за допомогою ІФА, використовуючи Аβ 1-40 для захоплення і кон'югований з пероксидазою хрому козячий анти-людський IgG для виявлення, як описано в Прикладі 1 (прямий ІФА). Антитіло A17D/R82S вводили в дослідження, що починалося незалежно порівняно з іншими антитілами. Проте, зразки плазми з цих двох різних досліджень аналізували за допомогою ІФА в той самий час, щоб уникнути розбіжностей між аналізами.

Як показано на кривих концентрація-час на Фігурі 2 і видно з обчислених ФК параметрів, представлених у Таблиці 1, ФК профілі антитіл даного винаходу (A17D, A17D/R79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S) суттєво відрізняються від BAN2401, особливо протягом перших 48 годин після введення. У той час як 6-кратне збільшення впливу, вимірюваного як площа під кривою (ППК_{0-inf}), спостерігалось для антитіла A17D порівняно з BAN2401, ППК для A17D/R79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S збільшилися в 10-11 разів (Таблиця 1). Також значення кінцевого часу напівжиття в сироватці антитіл даного винаходу були значно збільшені порівняно з BAN2401 (Таблиця 1).

Таблиця 1. Плазмові ФК параметри антитіл BAN2401, A17D, A17D/R79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S у мишей. Час напівжиття в сироватці і ППК_{0-inf} для всіх антитіл розраховували окремо для всіх тварин за допомогою некомпартментного аналізу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) і піддавали статистичному аналізу за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу з наступним застосуванням апостеріорного критерію множинного порівняння Бонфероні. Середні значення ППК_{0-inf} і середні значення кінцевого часу напівжиття в сироватці наведені в таблиці. Статистичні розбіжності в значеннях кінцевого часу напівжиття в сироватці і значеннях ППК_{0-inf} між BAN2401 і мутантами зазначені в таблиці, де *** означає p<0,001 і **** означає p<0,0001.

| Антитіло | ППК _{0-inf} (мг*год./мл) | Кінцевий час напівжиття (доба) |
|----------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| BAN2401 | 3,7 | 4,5 |
| A17D | 23,3**** | 8,7*** |
| A17D/R79T | 40,2**** | 10,7**** |
| A17D/R82S | 37,9**** | 22,2**** |
| A17D/R79T/R82S | 41,0**** | 10,9**** |

Приклад 4. Фармакокінетичні профілі антитіл у щурів

Фармакокінетичне дослідження антитіл BAN2401, A17D, A17D/R79T і A17D/R79T/R82S у щурів

Для вивчення фармакокінетичного профілю антитіл даного винаходу у щурів, 8-тижневим самкам щурів лінії Спрег-Доулі однократно вводили у вигляді внутрішньовенної ін'єкції 10 мг/кг антитіл BAN2401 (N=3), A17D (N=4), A17D/R79T (N=6) або A17D/R79T/R82S (N=5). У тварин брали кров через 0,5 год., 2 год., 7 год., 24 год., 2 доби, 4 доби, 7 діб, 14 діб і 29 діб після ін'єкції. Рівні BAN2401 і антитіл даного винаходу аналізували за допомогою ІФА, використовуючи Аβ 1-40 для захоплення і кон'югований з пероксидазою хрому козячий анти-людський IgG для виявлення, як описано в Прикладі 1 (прямий ІФА). Швидке зниження рівня BAN2401 у плазмі крові мишей дикого типу протягом перших 48 годин після введення, що призводить до низького впливу (Фігура 2), не спостерігалось у щурів, і замість цього антитіло BAN2401 і антитіла даного винаходу демонстрували подібні ФК профілі (Фігура 3). Статистичний аналіз значень часу напівжиття в сироватці і ППК_{0-inf}, обчислених окремо для всіх тварин у дослідженні, не показав значних розбіжностей у ППК_{0-inf} або кінцевому часі напівжиття в сироватці між BAN2401 і A17D або A17D/R79T/R82S (Таблиця 2). В той час як значуще збільшення ППК_{0-inf} було відмічено для A17D/R79T порівняно з BAN2401, але при цьому статистично значущої різниці не було виявлено в кінцевому часі напівжиття в сироватці між цими двома антитілами (Таблиця 2).

Таблиця 2. Плазмові ФК параметри антитіл BAN2401, A17D, A17D/R79T і A17D/R79T/R82S у щурів. Значення часу напівжиття в сироватці і ППК_{0-inf} для всіх антитіл розраховували окремо для всіх тварин за допомогою некомпартментного аналізу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) і піддавали статистичному аналізу за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу з наступним застосуванням апостеріорного критерію множинного порівняння Бонфероні. Середні значення ППК_{0-inf} і середні значення кінцевого часу напівжиття в

сироватці для антитіл BAN2401, A17D, A17D/R79T і A17D/R79T/R82S наведені в таблиці. Статистичні розбіжності в значеннях кінцевого часу напівжиття в сироватці і значеннях ППК_{0-inf} між BAN2401 і мутантами зазначені в таблиці, де ** позначає P<0,01.

| Антитіло | ППК _{0-inf} (мг*год./мл) | Кінцевий час напівжиття (доба) |
|----------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| BAN2401 | 31,1 | 10,2 |
| A17D | 38,0 | 10,9 |
| A17D/R79T | 47,6** | 12,8 |
| A17D/R79T/R82S | 36,6 | 11,2 |

5

Ex vivo аналіз активації Т-лімфоцитів неочищеним білковим екстрактом BAN2401, A17D, A17D/R79T і A17D/R79T/R82S

Щоб оцінити, чи здатні мутації, введені в антитіла даного винаходу, призводити до підвищеного ризику виникнення імунної відповіді в організмі людини, антитіла A17D, A17D/R79T і A17D/R79T/R82S аналізували порівняно з BAN2401 за допомогою ex vivo аналізу активації Т-лімфоцитів неочищеним білковим екстрактом. Аналіз тимчасової динаміки активації Т-лімфоцитів EpiScreen™ вимірює здатність антитіла викликати імунну відповідь CD4+ Т-лімфоцитів (Antitope Ltd, Cambridge, UK). Зразки аналізували з CD8+ виснаженими мононуклеарними клітинами периферичної крові (МКПК) з групи, що складається з 25 здорових донорів (Донор 1-25, Таблиця 3) з широкою HLA-різноманітністю. Здатність антитіл викликати імунну відповідь CD4+ Т-лімфоцитів вимірювали за проліферацією і секреції IL-2.

Результати дослідження показали, що загальний потенційний ризик імуногенності був низьким для BAN2401 і погранично низьким для A17D з 8 % і 12 % донорів, що показали позитивну реакцію, відповідно (Таблиця 3). Аналіз A17D/R79T і A17D/R79T/R82S виявив несподівано вищі ризики імуногенності, тому що об'єднана частота проліферації і секреції IL-2 становила 24 % і 20 % у досліджуваній групі, відповідно.

Таблиця 3. Узагальнені дані про проліферацію Т-лімфоцитів здорових донорів і секреції IL-2 при аналізі ELISpot для антитіл BAN2401, A17D, A17D/R79T і A17D/R79T/R82S. Позитивна відповідь у випадку проліферації Т-лімфоцитів позначена як "P", і позитивна відповідь в аналізі ELISpot позначена як "E". Пограничні відповіді позначені (*). Кореляція виражена у вигляді відсотку позитивних відповідей у випадку проліферації, що також виявилися позитивними в аналізі ELISpot. Реакція у одного донора вважалася позитивною в тому випадку, якщо і дані про проліферації, і результати аналізу ELISpot були позитивними. Гуманізоване антитіло A33 (Welt S et al., Clin Cancer Res. 2003 Apr; 9(4): 1347-53., 2003), що являє собою терапевтичне контрольне антитіло з відомою середньою імуногенністю 32 % в клініці, як правило, викликає позитивну відповідь у 20-30 % донорів в аналізі проліферації Т-лімфоцитів. Фітогемагглютинін (PHA) і гемоціанін фісурели (KLH) є могутніми антигенами, які використовуються як позитивні контролю.

| | BAN2401 | A17D | A17D/R79T | A17D/R79T/R28S | A33 | KLH | PHA |
|----------|---------|------|-----------|----------------|-----|-----|-----|
| Донор 1 | | | | PE | | PE | PE |
| Донор 2 | | PE | P*E | | PE | PE | PE |
| Донор 3 | | | E* | | | PE | PE |
| Донор 4 | | | | | | PE | PE |
| Донор 5 | | | | | | PE | PE |
| Донор 6 | | | | | | PE | PE |
| Донор 7 | | | | | | PE | PE |
| Донор 8 | | | PE | PE | | PE | PE |
| Донор 9 | | | | | | PE | PE |
| Донор 10 | | | | | | PE | PE |
| Донор 11 | | | | | | E | PE |
| Донор 12 | | | | | | P* | PE |
| Донор 13 | | | | | PE | PE | PE |
| Донор 14 | | | PE | PE | PE | PE | PE |
| Донор 15 | | | | | P | PE | PE |
| Донор 16 | PE | P | P | P | E | PE | PE |
| Донор 17 | | | PE | PE | PE | PE | PE |
| Донор 18 | | | | | | PE | PE |
| Донор 19 | PE | PE | PE | PE | | PE | PE |

| | | | | | | | |
|--------------------------|----|-----|----|----|----|----|-----|
| Донор 20 | | | | | | PE | PE |
| Донор 21 | P | PE* | P | P | | PE | PE |
| Донор 22 | | | | | | E | PE |
| Донор 23 | | | PE | | | PE | PE |
| Донор 24 | | | | E | PE | PE | PE |
| Донор 25 | | | | | | PE | PE |
| Проліферація % | 12 | 16 | 32 | 28 | 24 | 92 | 100 |
| ELISpot % | 8 | 12 | 28 | 24 | 24 | 96 | 100 |
| Проліферація і ELISpot % | 8 | 12 | 24 | 20 | 20 | 88 | 100 |
| Кореляція % | 67 | 75 | 75 | 71 | 83 | 96 | 100 |

Скринінг епітопів Т-лімфоцитів антитіла BAN2401 in silico

З метою подальшого вивчення ризику імуногенності, що може бути пов'язаний з мутаціями, і для пошуку відповідних положень для деімунізації, антитіла BAN2401, A17D, A17D/79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S піддавали скринінгу in silico на наявність епітопів Т-лімфоцитів. Послідовності варіабельних ділянок антитіл BAN2401, A17D, A17D/R79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S були передані в компанію Antitope Ltd (Cambridge, UK) для аналізу in silico за допомогою технологій, iTope™ і TCED™, що є її власністю. Ніяких послідовностей, які зв'язуються з різними зародковими молекулами МНС класу II, не було ідентифіковано як у важких, так і в легких ланцюгах аналізованих антитіл. Аналіз TCED™ з використанням пошуку за допомогою алгоритму BLAST виявив дві часткові відповідності з раніше ідентифікованими епітопами в базі даних пептидів з відомою імуногенністю ex vivo.

Ex vivo картування епітопів Т-лімфоцитів антитіл BAN2401, A17D, A17D/R79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S

Для верифікації ризику імуногенності, що може бути пов'язаний з новими мутаціями, і визначення положень для деімунізації, 44 пептиду (15-міри), отриманих з варіабельних ділянок антитіл BAN2401, A17D, A17D/R79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S, аналізували на наявність епітопів CD4+ Т-лімфоцитів за допомогою технології картування епітопів Т-лімфоцитів EpiScreen™ (Antitope Ltd, Cambridge, UK). Ці пептиди були вибрані таким чином, щоб охопити всі потенційні епітопи Т-лімфоцитів, ідентифіковані за допомогою скринінгу in silico, а також дві нові ділянки, що охоплюють ділянки заміни A17D і заміни R79T і R82S (включаючи пептиди, як з мутаціями, так і без них).

Пептиди аналізували в групі, що складається з 11 донорів, відібраних з учасників аналізу неочищених антитіл EpiScreen™, описаного в попередньому розділі. Т-клітинну імунну відповідь вимірювали у кожного донора для кожного пептиду за допомогою аналізу проліферації, що вимірює включення ³[H]-тимідину. В результаті в цих послідовностях була ідентифікована наявність трьох потенційних епітопів Т-лімфоцитів (Епітоп 1, 5 і 8). "Епітоп 1", який є присутнім у важкому ланцюзі, розглядали як слабкий. "Епітоп 5", що включає в себе мутацію A17D, був слабким, і у жодного з донорів не спостерігалася відповідь на відповідний пептид послідовності BAN2401 дикого типу. "Епітоп 8" являв собою найбільш значущий епітоп, виходячи з частоти Т-клітинної імунної відповіді, і він був виявлений в пептидах антитіл A17D/R79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S, але не в пептидах дикого типу BAN2401 або A17D.

Дані ex vivo картування епітопів Т-лімфоцитів підтверджують висновок, зроблений за результатами аналізу тимчасової динаміки активації Т-лімфоцитів неочищеними антитілами, про те, що антитіла A17D/R79T і A17D/R79T/R82S пов'язані з підвищеним загальним ризиком імуногенності. Крім того, антитіло A17D/R82S (не включене в аналіз активації Т-лімфоцитів неочищеними антитілами) також, очевидно, має підвищений ризик імуногенності через мутацію R82S в "Епітопі 8".

Деімунізація пептидів, ідентифікованих як потенційні епітопи Т-лімфоцитів, за допомогою ex vivo картування епітопів Т-лімфоцитів

Як правило, деімунізація досягається за рахунок зміни однієї амінокислоти в одному з важливих якірних положень (п1, п4, п6, п7 і п9 9-міра) пептиду, що потенційно зв'язується з молекулами МНС класу II. Конкретні деімунізуючі мутації в трьох епітопах, ідентифікованих при ex vivo картуванні пептидів (Епітоп 1, 5 і 8), описаних вище, були вибрані. Заміни вибирали на основі очікуваного зменшення афінності зв'язування пептиду зі зв'язувальною кишенею молекули МНС класу II. Дві деімунізуючі мутації перевіряли для кожного пептиду, що був ідентифікований як потенційно імуногенний, і ці пептиди були проаналізовані разом з вихідними пептидами BAN2401, A17D, A17D/R79T, A17D/R82S і A17D/R79T/R82S за допомогою технології картування пептидів EpiScreen™.

Т-клітинну імунну відповідь вимірювали у кожного донора для кожного пептиду за допомогою аналізу проліферації, що вимірює включення ^3H -тимідину. Результати цього дослідження підтвердили раніше зроблені висновки, але всі епітопи (Епітоп 1, 5 і 8) у цьому дослідженні показали себе як слабкі (Таблиця 4). Проте, всі деімунізуючі заміни успішно знижували ризик імуногенності для пептидів, що охоплюють три епітопи, порівняно з вихідними пептидами з відсутністю або з дуже невеликим числом донорів з Т-клітинною імунною відповіддю (Таблиця 4). Це свідчить про те, що вибрані заміни виявилися ефективними, і що деімунізація була успішною.

Таблиця 4. Результати деімунізації на рівні пептидів епітопів, ідентифікованих як імуногенні за допомогою технології картування епітопів Т-лімфоцитів EpiScreen™. Показані пептиди, отримані з антитіла BAN2401 і антитіл даного винаходу, що були ідентифіковані як імуногенні, і ті самі пептиди з введеними деімунізуючими замінами (підкреслені). Мутації, що збільшують час напівжиття, виділені жирним шрифтом. Всі деімунізовані пептиди перевіряли в ex vivo аналізі активації Т-лімфоцитів, і результати показані в крайньому правому стовпці (частота відповіді у донорів).

| Ділян- ка епітопу | Антитіло - джерело пептиду і деімунізуючі заміни | Пептид | Частота відповідей (%) |
|-------------------------|---|--------------------------------|------------------------------|
| 1. | BAN2401 і антитіла винаходу* | SFGMHWVRQA | 12 |
| | | PGKGL | |
| | A→N | SFGMHWVRQ <u>N</u> | 0 |
| | | PGKGL | |
| | A→T | SFGMHWVRQ <u>T</u> | 4 |
| | | PGKGL | |
| 5. | Всі антитіла винаходу (мутація A17D) | PVTPG D PASISC | 16 |
| | | RSS | |
| | I→V | PVTPG D PAS <u>V</u> SC | 0 |
| | | RSS | |
| | V→A | P <u>A</u> TPG D PASISC | 0 |
| | | RSS | |
| 8. | A17D/R79T (мутація R79T) | SGSGTDFTLTIS | 16 |
| | | RVE | |
| | S→Q | SGSGTDFTLT <u>I</u> Q | 4 |
| | | RVE | |
| | E→D | SGSGTDFTLTIS | 4 |
| | | RVD <u>I</u> | |
| 8. | A17D/R79T (мутація R79T) | GTD | |
| | | FTLT | |
| | | ISRV | 20 |
| | | EAE | |
| | | D | |

| | | | |
|----|------------------------------------|--------------|----|
| | | GTDFTLTIQRVE | 0 |
| | S→Q | AED | |
| | | GTDFLTISRVD | 0 |
| | E→D | AED | |
| 8. | A17D/R79T/R82S (мутації R79T/R82S) | SGSGTDFLTIS | 12 |
| | | SVE | |
| | S→Q | SGSGTDFLTIQ | 0 |
| | | SVE | |
| | E→D | SGSGTDFLTIS | 0 |
| | | SVD | |
| 8. | A17D/R79T/R82S (мутації R79T/R82S) | GTDFLTISSVE | 16 |
| | | AED | |
| | S→Q | GTDFLTIQSVE | 0 |
| | | AED | |
| | E→D | GTDFLTISSVD | 0 |
| | | AED | |
| 8. | A17D/R82S (мутація R82S) | SGSGTDFTLRIS | 12 |
| | | SVE | |
| | S→Q | SGSGTDFTLRIQ | 0 |
| | | SVE | |
| | E→D | SGSGTDFTLRIS | 4 |
| | | SVD | |
| 8. | A17D/R82S (мутація R82S) | GTDFTLRISSVE | 16 |
| | | AED | |
| | S→Q | GTDFTLRIQSVE | 4 |
| | | AED | |
| | E→D | GTDFTLRISSVD | 4 |
| | | AED | |

*) Не деімунізовані антитіла

5

Дизайн і отримання деімунізованих варіантів A17D/R79T

Дизайн восьми деімунізованих варіантів A17D/R79T здійснювали на основі результатів картування епітопів Т-лімфоцитів і деімунізації пептидів, описаних вище. В усіх трьох епітопах, ідентифікованих як потенційно імуногенні, деімунізуючі мутації, для яких при ex vivo картуванні

10

епітопів Т-лімфоцитів було показано, що вони зменшують імуногенність, були введені в комбінаціях, зазначених у Таблиці 5.

Таблиця 5. Узагальнені дані про вісім деімунізованих варіантів подвійного мутанту A17D/R79T. Вибрані деімунізуючі мутації епітопів 1, 5 і 8, функціональність яких була перевірена на рівні пептидів у ex vivo аналізі активації Т-лімфоцитів, зазначені для конкретних антитіл. Використовували N-кінцеву нумерацію. VH=варіабельний важкий ланцюг, VL=варіабельний легкий ланцюг.

| Варіанти A17D/R79T | Деімунізація в епітопі 1 (VH) | Деімунізація в епітопі 5 (VL) | Деімунізація в епітопі 8 (VL) |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| A17D/R79T_DI 1 | A40N | I21V | S81Q |
| A17D/R79T_DI 2 | A40N | I21V | E84D |
| A17D/R79T_DI 3 | A40N | V13A | S81Q |
| A17D/R79T_DI 4 | A40N | V13A | E84D |
| A17D/R79T_DI 5 | A40T | I21V | S81Q |
| A17D/R79T_DI 6 | A40T | I21V | E84D |
| A17D/R79T_DI 7 | A40T | V13A | S81Q |
| A17D/R79T_DI 8 | A40T | V13A | E84D |

Приклад 6. Характеристика цільового зв'язування деімунізованих антитіл

Зв'язування з Аβ-протофібрилами зберігається у восьми деімунізованих варіантів A17D/R79T, (A17D/R79T_DI 1-8) порівняно з BAN2401

Профілі цільового зв'язування восьми деімунізованих варіантів A17D/R79T, (A17D/R79T_DI 1-8) аналізували порівняно з BAN2401 (контроль) за допомогою методу інгібування, описаного в Прикладі 1 (інгібувальний ІФА). Результати представлені на Фігурі 4, де показаний аналіз зв'язування і вибіркості для Аβ-протофібрил порівняно з Аβ-мономерами для A17D/R79T_DI 1-8 і BAN2401. Ці результати показують, що зв'язування і вибіркості зв'язування з Аβ-протофібрилами порівняно зі зв'язуванням Аβ-мономером зберігається у антитіл даного винаходу (A17D/R79T_DI 1-8).

Приклад 7. Фармакокінетичні профілі деімунізованих антитіл у мишей

Фармакокінетичне дослідження антитіл BAN2401, A17D/R79T і деімунізованих варіантів A17D/R79T (A17D/R79T_DI 1-8) у мишей дикого типу

Для порівняння ФК профілів восьми деімунізованих варіантів A17D/R79T (A17D/R79T_DI 1-8) з ФК профілем BAN2401 і A17D/R79T у мишей дикого типу, 8-10-тижневих самиць мишей лінії C57BL/6 розподіляли за групами (N=5), і однократно вводили їм у вигляді внутрішньовенної ін'єкції 10 мг/кг антитіла. У тварин брали кров через 0,5 год., 2 доби, 7 діб, 14 і 28 діб після введення, і рівні BAN2401 і антитіл даного винаходу аналізували за допомогою ІФА, використовуючи Аβ 1-40 для захоплення і кон'югований з пероксидазою хрому козячий антилюдський IgG для виявлення, як описано в Прикладі 1 (прямої ІФА). Як показано на кривих концентрація-час на Фігурі 5, ФК профілі деімунізованих мутантів A17D/R79T, (A17D/R79T_DI 1-8) подібні з ФК профілем A17D/R79T і відрізняються від BAN2401. Ці результати свідчать про те, що і ППК_{0-inf} і кінцевий час напівжиття в сироватці A17D/R79T і деімунізованих варіантів (A17D/R79T_DI 1-8) були значно збільшені порівняно з BAN2401 (Таблиця 6). Таким чином, всі деімунізовані варіанти показали покращений ФК профіль порівняно з BAN2401, і ці ФК профілі виявилися подібними з ФК профілем A17D/R79T з підвищеним впливом збільшеним періодом напіввиведення.

Таблиця 6. Плазмові ФК параметри антитіл BAN2401, A17D/R79T і деімунізованих варіантів A17D/R79T, (A17D/R79T_DI 1-8) у мишей. Час напівжиття в сироватці і ППК_{0-inf} для всіх антитіл розраховували окремо для всіх тварин за допомогою некомпартментного аналізу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) і піддавали статистичному аналізу за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу з наступним застосуванням апостеріорного критерію множинного порівняння Бонфероні. Середні значення ППК_{0-inf} і середні значення кінцевого часу напівжиття в сироватці наведені в таблиці. Статистичні розбіжності в значеннях кінцевого часу напівжиття в сироватці і значеннях ППК_{0-inf} між BAN2401 і мутантами зазначені в таблиці, де * означає P<0,05, ** означає P<0,01, *** означає P<0,001 і **** означає P<0,0001.

| Антитіло | ППК _{0-inf} (мг*ч/мл) | Кінцевий час напівжиття (доба) |
|----------------|--------------------------------|--------------------------------|
| BAN2401 | 3,6 | 3,5 |
| A17D/R79T | 38,0**** | 10,7** |
| A17D/R79T_DI 1 | 42,3**** | 13,0*** |
| A17D/R79T_DI 2 | 40,4**** | 10,5** |
| A17D/R79T_DI 3 | 44,9**** | 12,6*** |
| A17D/R79T_DI 4 | 43,7**** | 12,7*** |
| A17D/R79T_DI 5 | 32,6**** | 10,4* |
| A17D/R79T_DI 6 | 33,4**** | 12,2*** |
| A17D/R79T_DI 7 | 41,7**** | 14,2**** |
| A17D/R79T_DI 8 | 43,8**** | 10,0* |

Приклад 8. Фармакокінетичні профілі деіmunізованих антитіл у щурів

Фармакокінетичні профілі антитіл BAN2401, A17D/R79T і деіmunізованих варіантів A17D/R79T, (A17D/R79T_DI 1-8) у щурів.

Для порівняння ФК профілів восьми деіmunізованих варіантів A17D/R79T (A17D/R79T_DI 1-8) з ФК профілем BAN2401 і A17D/R79T у щурів, 8-тижневих самиць щурів лінії Спрег-Доулі розподіляли за групами (N=5), і однократно вводили їм у вигляді внутрішньовенної ін'єкції 10 мг/кг антитіла. У тварин брали кров через 0,5 год., 2 доби, 7 діб, 14 діб і 28 діб після ін'єкції, і рівні BAN2401 і антитіл даного винаходу аналізували за допомогою ІФА, використовуючи Аβ 1-40 для захоплення і кон'югований з пероксидазою хрому козячий анти-людський IgG для виявлення (Приклад 1, прямої ІФА).

Як показано на Фігурі 6, BAN2401, A17D/R79T і деіmunізовані варіанти A17D/R79T (A17D/R79T_DI 1-8) показали практично аналогічні ФК профілі у щурів. Ці результати свідчать про те, що A17D/R79T_DI 1 має значно триваліший кінцевий час напівжиття в сироватці, ніж BAN2402 у щурів (p<0,05), в той час як значення ППК_{0-inf} було значно більшим для A17D/R79T, A17D/R79T_DI 1 і A17D/R79T_DI 4 порівняно з BAN2401 (p<0,01) (Таблиця 7).

Таблиця 7. Плазмові ФК параметри антитіл BAN2401, A17D/R79T і деіmunізованих варіантів A17D/R79T, (A17D/R79T_DI 1-8) у щурів. Значення часу напівжиття в сироватці і ППК_{0-inf} для всіх антитіл розраховували окремо для всіх тварин за допомогою некомпартментного аналізу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) і піддавали статистичному аналізу за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу з наступним застосуванням апостеріорного критерію множинного порівняння Бонфероні. Середні значення ППК_{0-inf} і середні значення кінцевого часу напівжиття в сироватці для антитіл BAN2401, A17D, A17D/R79T і A17D/R79T/R82S наведені в таблиці. Статистичні розбіжності в значеннях кінцевого часу напівжиття в сироватці і значеннях ППК_{0-inf} між BAN2401 і антитілами даного винаходу зазначені в таблиці, де * означає P<0,05 і ** означає P<0,01.

| Антитіло | ППК _{0-inf} (мг*год./мл) | Кінцевий час напівжиття (доба) |
|----------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| BAN2401 | 35,1 | 10,2 |
| A17D/R79T | 48,6** | 11,0 |
| A17D/R79T_DI 1 | 47,3** | 13,3* |
| A17D/R79T_DI 2 | 33,7 | 11,8 |
| A17D/R79T_DI 3 | 43,1 | 11,7 |
| A17D/R79T_DI 4 | 47,3** | 11,7 |
| A17D/R79T_DI 5 | 44,1 | 11,6 |
| A17D/R79T_DI 6 | 39,6 | 11,3 |
| A17D/R79T_DI 7 | 35,6 | 11,8 |
| A17D/R79T_DI 8 | 40,9 | 10,6 |

Приклад 9. Фармакокінетичні профілі деіmunізованих антитіл у мавп

Фармакокінетичні профілі антитіл BAN2401, A17D/R79T_DI 3, A17D/R79T_DI 4 і A17D/R79T_DI 8 у макак-крабоїдів.

Для порівняння ФК профілів A17D/R79T_DI 3, A17D/R79T_DI 4 і A17D/R79T_DI 8 з ФК профілем BAN2401 у мавп, самців макаки-крабоїда розподіляли за групами (N=3) і однократно вводили їм внутрішньовенні інфузії антитіла BAN2401 у кількості 5 мг/кг або антитіл даного винаходу в кількості 10 мг/кг. У мавп, що отримували BAN2401, брали кров через 5 хв., 1 год., 2 год., 8 год., 24 год., 2 доби, 4 доби, 7 діб, 14 діб 21 добу і 28 діб після введення, в той час як у

мавп, що отримували антитіла даного винаходу, брали кров через 5 хв., 2 год., 24 год., 3 доби, 7 діб, 14 діб 21 добу і 28 діб після введення. Концентрацію в плазмі введених антитіл аналізували за допомогою ІФА, як описано в Прикладі 1 (прямої ІФА). ФК профілі показані у вигляді кривих концентрація-час на Фігурі 7, де значення часу напівжиття в сироватці і ППК_{0-inf} для всіх антитіл розраховували за допомогою некомпартментного аналізу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) (Таблиця 8).

Таблиця 8. Плазмові ФК параметри антитіл BAN2401, A17D/R79T_DI 3, A17D/R79T_DI 4 і A17D/R79T_DI 8 у макак-крабоїдів. Значення кінцевого часу напівжиття в сироватці і ППК_{0-inf} для всіх антитіл розраховували за допомогою некомпартментного аналізу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight). ФК параметри для BAN2401, що наводяться тут, отримані з окремого дослідження, в якому антитіло BAN2401 вводили шляхом внутрішньовенної інфузії в дозі 5 мг/кг. Для полегшення порівняння ППК між BAN2401 і антитілами даного винаходу, скориговані з урахуванням дози середні значення ППК_{0-inf} і середні значення кінцевого часу напівжиття в сироватці наведені в таблиці.

| Антитіло | Скоригована з урахуванням дози ППК _{0-inf} (мг*год./мл) на (мг/кг) | Кінцевий час напівжиття (доба) |
|----------------|---|--------------------------------|
| BAN2401 | 5,3 | 12,0 |
| A17D/R79T_DI 3 | 6,1 | 12,0 |
| A17D/R79T_DI 4 | 6,5 | 12,6 |
| A17D/R79T_DI 8 | 7,1 | 17,2 |

Приклад 10. Просте алометричне масштабування - від мишей, щурів і мавп до людини
Об'єм

Для того щоб передбачити час напівжиття антитіл даного винаходу (тут показано для A17D/R79T_DI 3, A17D/R79T_DI 4 і A17D/R79T_DI 8) у людини застосовували двокомпартментне моделювання і просте алометричне масштабування. Двокомпартментну модель застосовували для плазмових ФК профілів BAN2401 і антитіл даного винаходу з використанням програми Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight), для того щоб оцінити значення кліренсу (CL) і об'єму (V) у мишей, щурів і мавп. Значення CL і V наносили на графік навпроти маси тіла і застосовували просте алометричне масштабування (Deng et al. mAbs 2011: 3(1): p. 61-66. doi:10.4161/mabs.3.1.13799). Кінцевий час напівжиття в сироватці обчислювали за таким рівнянням:

Кліренс

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2) * \text{Об'єм}}{\text{Кліренс}}$$

При простому алометричному масштабуванні обсягу і кліренсу значення оцінюваних параметрів у видів, які використовуються в доклінічному дослідженні, наносили на графік навпроти маси тіла. Константу та експоненту з лінії регресії використовували для прогнозування V і CL у людини з масою тіла 70 кг. І експонента (яка переважно має становити приблизно 0,85 для кліренсу і 1 для обсягу), і зчепленість з лінією регресії є показниками вірогідності оцінки конкретних параметрів у людини.

Як показано на Фігурі 11, антитіло BAN2401 має погану лінійну кореляцію системного CL, що призводить до невизначеного простого алометричного масштабування. Відхилення від експоненти (яка має бути ближче до 0,85) свідчить про те, що погана кореляція є наслідком високого кліренсу BAN2401 у мишей. Це призводило до недооцінки очікуваного CL у людини і, отже, до завищеної оцінки прогнозованого кінцевого часу напівжиття в сироватці. Кінцевий час напівжиття в сироватці антитіла BAN2401 було оцінено на рівні 41 доби, що значно відрізнялося від часу напівжиття, визначеного в клінічних умовах (5-7 діб). Фактичний CL антитіла BAN2401 показаний на Фігурі 11 (білі квадрати). На відміну від поганої лінійної кореляції між мишею, щуром і макакою-крабоїдом для BAN2401, антитіла даного винаходу (A17D/R79T_DI 3, A17D/R79T_DI 4 і A17D/R79T_DI 8) показали чудову кореляцію (Фігура 11). Розраховані на основі передбачених ФК параметрів значення кінцевого часу напівжиття в сироватці в людини свідчать про те, що час напівжиття в сироватці у людини для антитіл A17D/R79T_DI 3, A17D/R79T_DI 4 і A17D/R79T_DI 8 становить 13, 15 і 20 діб, відповідно. Просте алометричне масштабування для об'єму (V) свідчить про добру лінійну кореляцію, і експонента становить приблизно 1 для BAN2401 і антитіл даного винаходу (не показано).

Антитіла даного винаходу демонструють лінійну кореляцію CL серед видів з достовірнішим алометричним масштабуванням, і вони поведуться як інші терапевтичні IgGls, такі як

бевацизумаб, омалізумаб і трастузумаб, описані в Deng et al., Expert Opin. Drug Metab. Toxicol 8(2) (2012): р. 141-160., з часом напівжиття у людини приблизно 15-30 діб. На відміну від антитіла BAN2401 з неоптимальним ФК профілем у миші і людини, що відрізняється від багатьох інших терапевтичних IgGls, антитіла даного винаходу були сконструйовані таким чином, що в результаті вони мали нормалізований ФК профіль у мишей. Їхні ФК профілі і значення часу напівжиття в сироватці в мишей, щурів і макак-крабоїдів є подібними з іншими терапевтичними IgGls з часом напівжиття у людини приблизно 15-30 діб. Ці результати свідчать про те, що збільшений час напівжиття в сироватці антитіл даного винаходу у мишей буде мати місце і у людини.

10

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <110> BioArctic Neuroscience AB
Eisai R&D Management Co., Ltd.
- <120> Покращені антитіла, які зв'язують АВ-протофібрили
- <130> P141879WO00
- <140> PCT
<141> 2015-07-08
- <150> US 62/022952
<151> 2014-07-10
- <160> 24
- <170> Патентна версія 3.5
- <210> 1
<211> 5
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
- <220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид
- <400> 1
- Ser Phe Gly Met His
1 5
- <210> 2
<211> 17
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
- <220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид
- <400> 2
- Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
- Gly
- <210> 3
<211> 15
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
- <220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид
- <400> 3

Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 4
<211> 16
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

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

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

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

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

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

<400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 7
<211> 112
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

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

<400> 7

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

Ala Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 8

<211> 112

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<220>

<221> Інша ознака

<222> (13)..(13)

<223> Хаа може бути Val або Ala

<220>

<221> Інша ознака

<222> (17)..(17)

<223> Хаа може бути Ala, Asp, Glu, Gln або їхній функціональний аналог

<220>

<221> Інша ознака

<222> (21)..(21)

<223> Хаа може бути Ile або Val

<220>

<221> Інша ознака

<222> (79)..(79)

<223> Хаа може бути Arg, Thr, Lys, Ala, Gly або їхній функціональний аналог

<220>

<221> Інша ознака

<222> (81)..(81)

<223> Хаа може бути Ser або Gln

<220>

<221> Інша ознака
 <222> (82)..(82)
 <223> Хаа може бути Arg, Ser, Cys, Gly, Asn або їхній функціональний аналог

<220>
 <221> Інша ознака
 <222> (84)..(84)
 <223> Хаа може бути Glu або Asp

<400> 8

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

Xaa Pro Ala Ser Xaa Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Xaa Xaa Val Xaa Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 9
 <211> 112
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

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

<400> 9

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

Asp Pro Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Gln Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 10

<211> 112

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 10

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

Asp Pro Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Asp Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 11

<211> 112

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 11

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

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Gln Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 12

<211> 112

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 12

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

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Asp Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13

<211> 124

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 13

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 124

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<220>
 <221> Інша ознака
 <222> (37)..(37)
 <223> Хаа може бути Val або Ile

<220>
 <221> Інша ознака
 <222> (38)..(38)
 <223> Хаа може бути Arg або Gln

<220>
 <221> Інша ознака
 <222> (40)..(40)
 <223> Хаа може бути Ala, Asn або Thr

<400> 14

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

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

Gly Met His Trp Xaa Xaa Gln Xaa Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 124
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

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

<400> 15

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 124

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 16

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

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

Gly Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 124

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 124

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 18

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19

<211> 112

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 19

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

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

```
<210> 20
<211> 112
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
```

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

<400> 20

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

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

```
<210> 21
<211> 112
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
```

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

<400> 21

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

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 22

<211> 112

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<400> 22

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

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys


```

100                               105                               110

<210> 23
<211> 330
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20          25          30

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80

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

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100         105         110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115         120         125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130         135         140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145         150         155         160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165         170         175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180         185         190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195         200         205

```

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 24
<211> 107
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

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

85

90

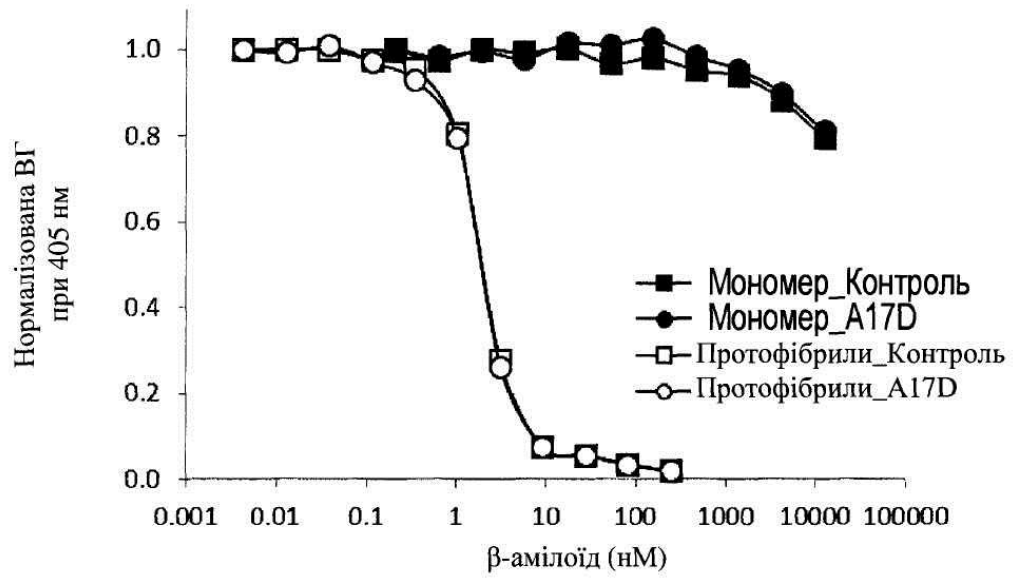
95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

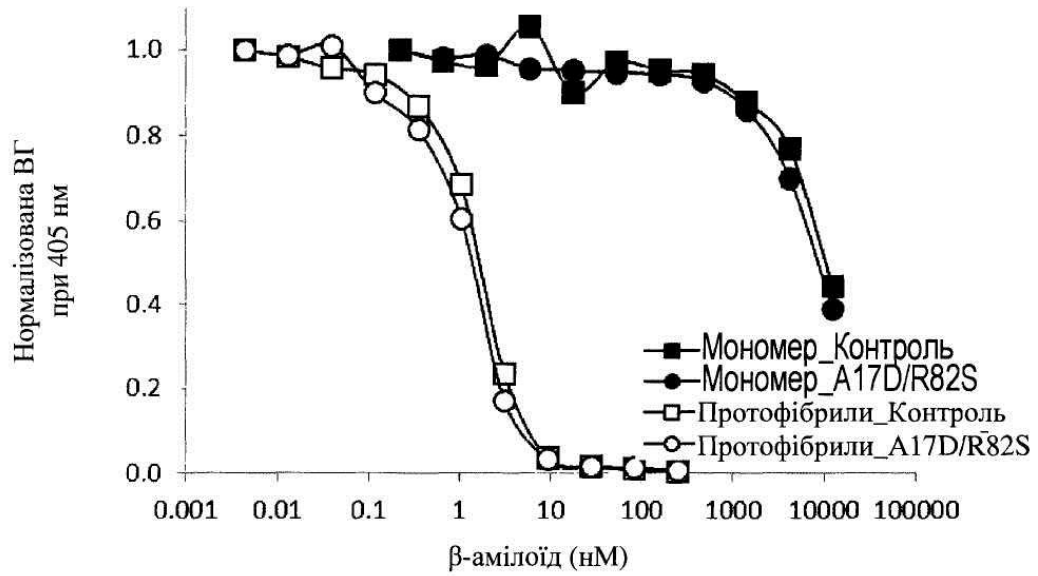
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, який має афінність до Аβ-протофібрил, де це антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент має варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовності амінокислот SEQ ID NO: 12, і варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовності амінокислот SEQ ID NO: 16.
- 10 2. Антитіло за п. 1, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить константну ділянку важкого ланцюга IgG.
3. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1 разом з фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною і/або розріджувачами.
4. Спосіб зменшення кількості Аβ-протофібрил у суб'єкта, який включає введення зазначеному суб'єкту терапевтично ефективної кількості антитіла або його антигензв'язувального фрагмента
- 15 за п. 1.
5. Спосіб лікування хвороби Альцгеймера або іншого порушення, пов'язаного з агрегацією Аβ білка у суб'єкта, що має зазначене захворювання або порушення, який включає введення зазначеному суб'єкту терапевтично ефективної кількості антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за п. 1.
- 20 6. Спосіб лікування хвороби Альцгеймера у суб'єкта, що має хворобу Альцгеймера, який включає введення зазначеному суб'єкту терапевтично ефективної кількості антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за п. 1.

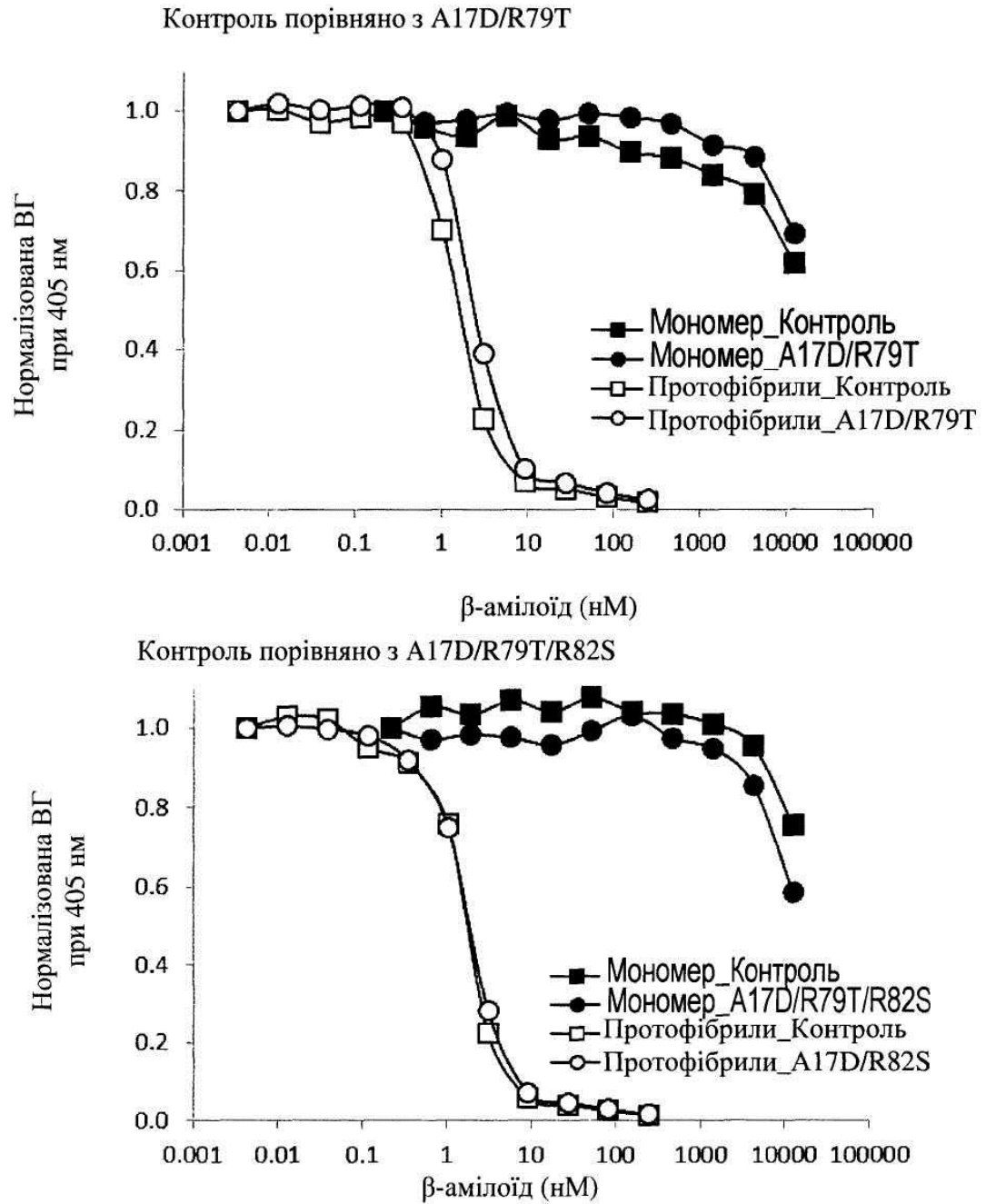
Контроль порівняно з A17D



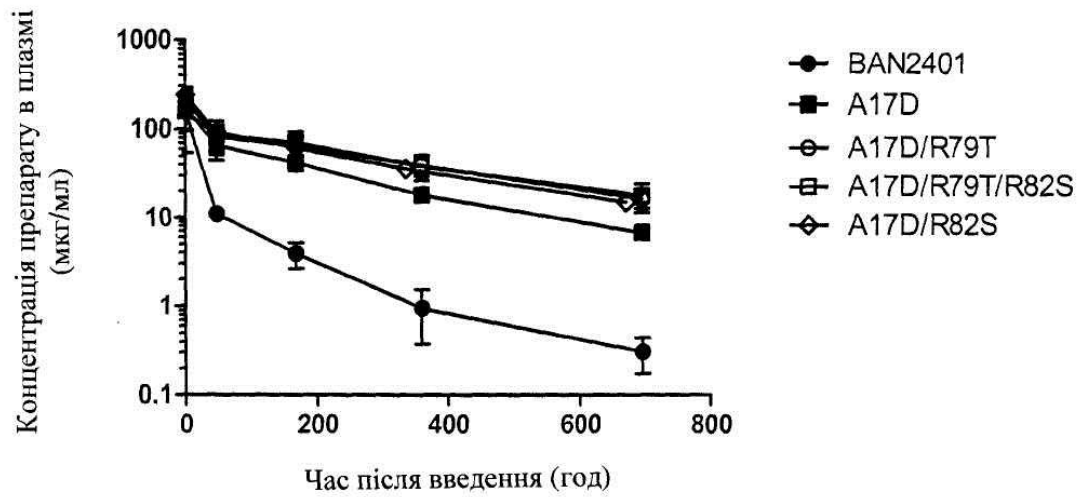
Контроль порівняно з A17D/R82S



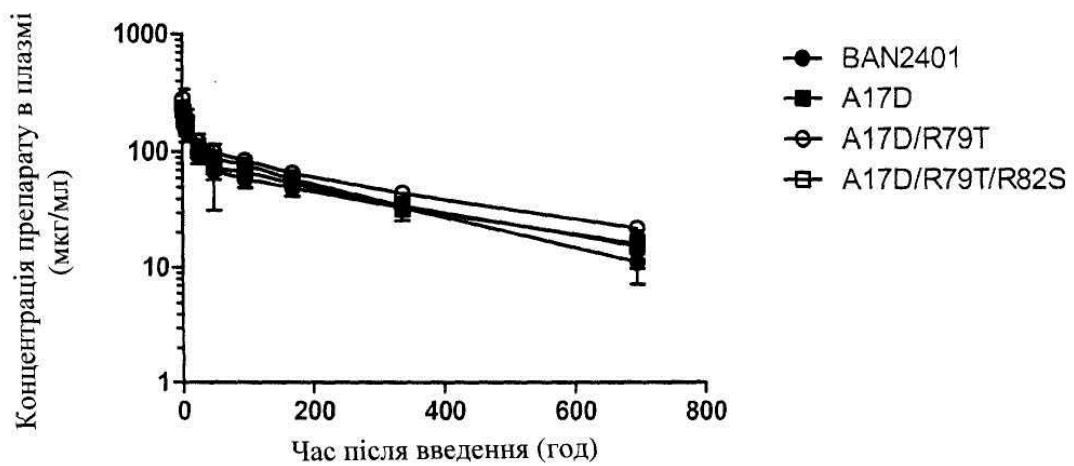
Фіг. 1



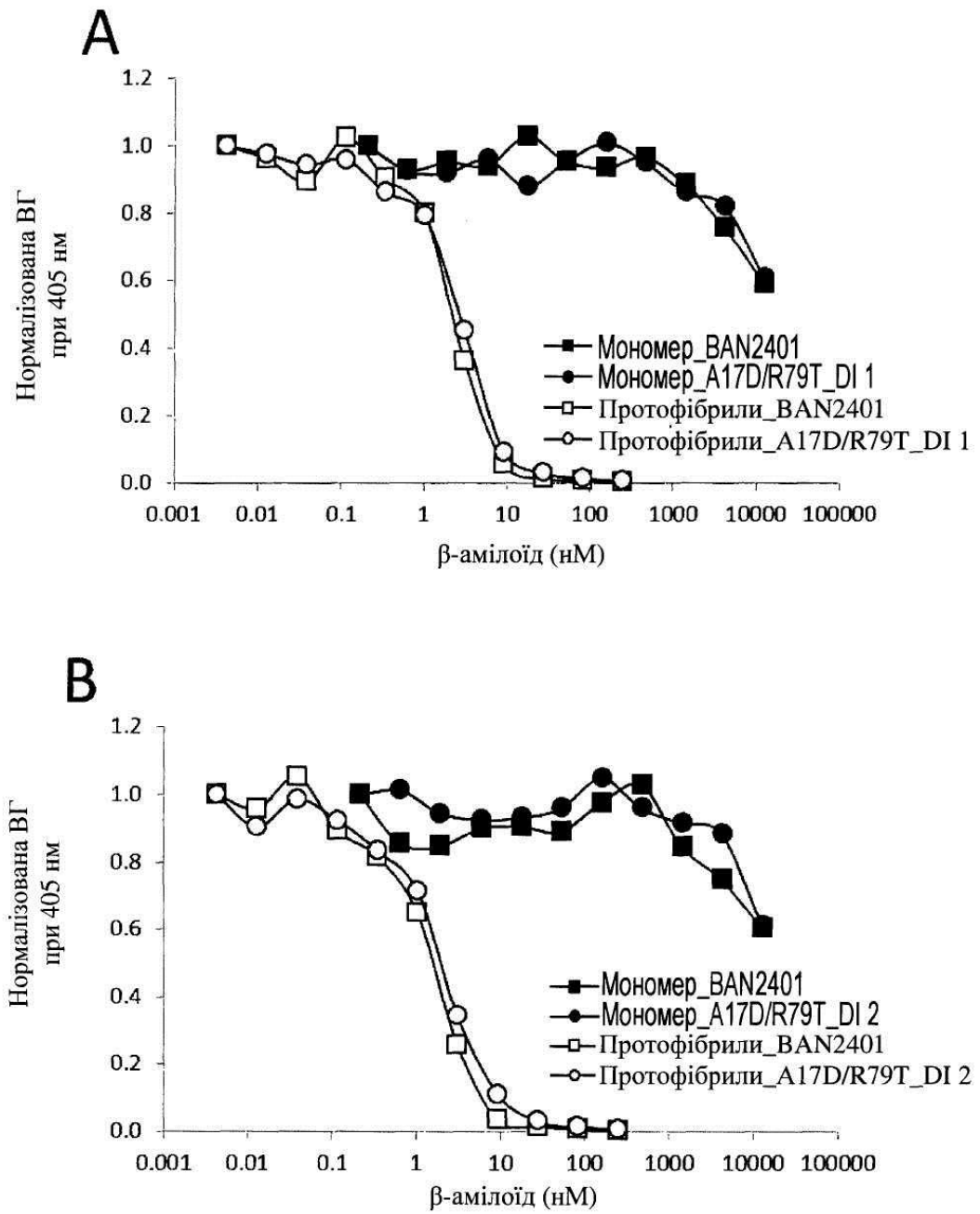
Фіг. 1 (продовження)



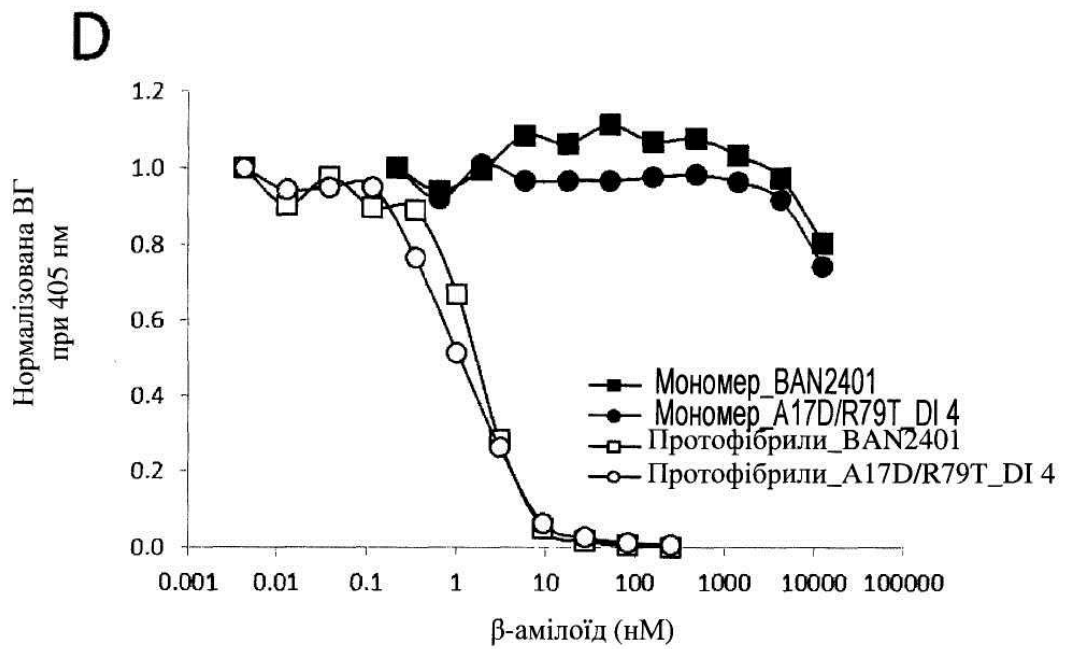
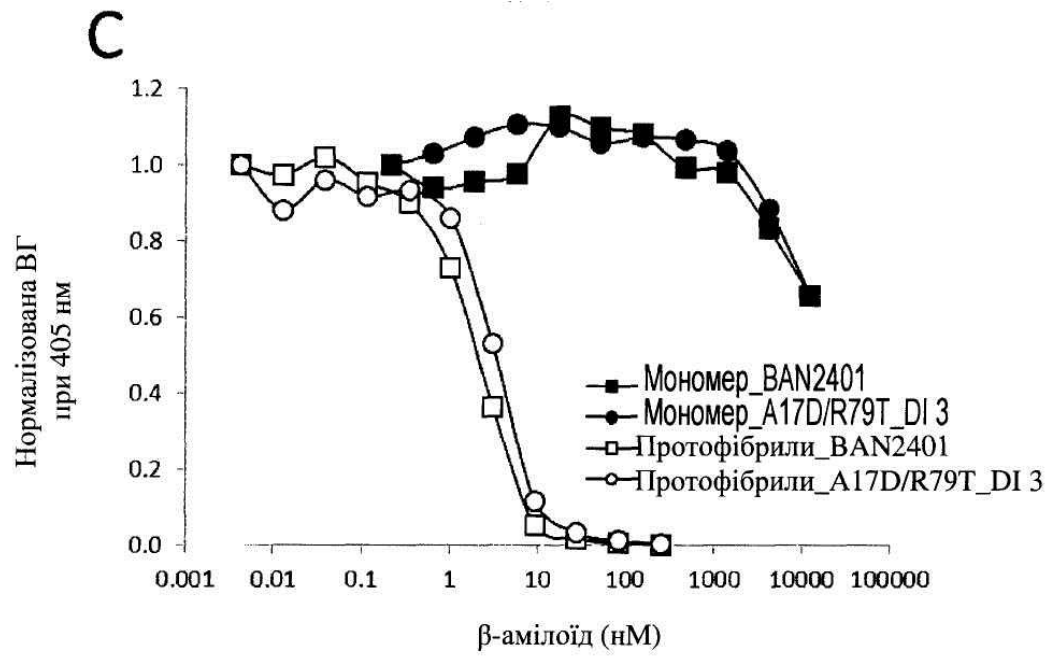
Фіг. 2



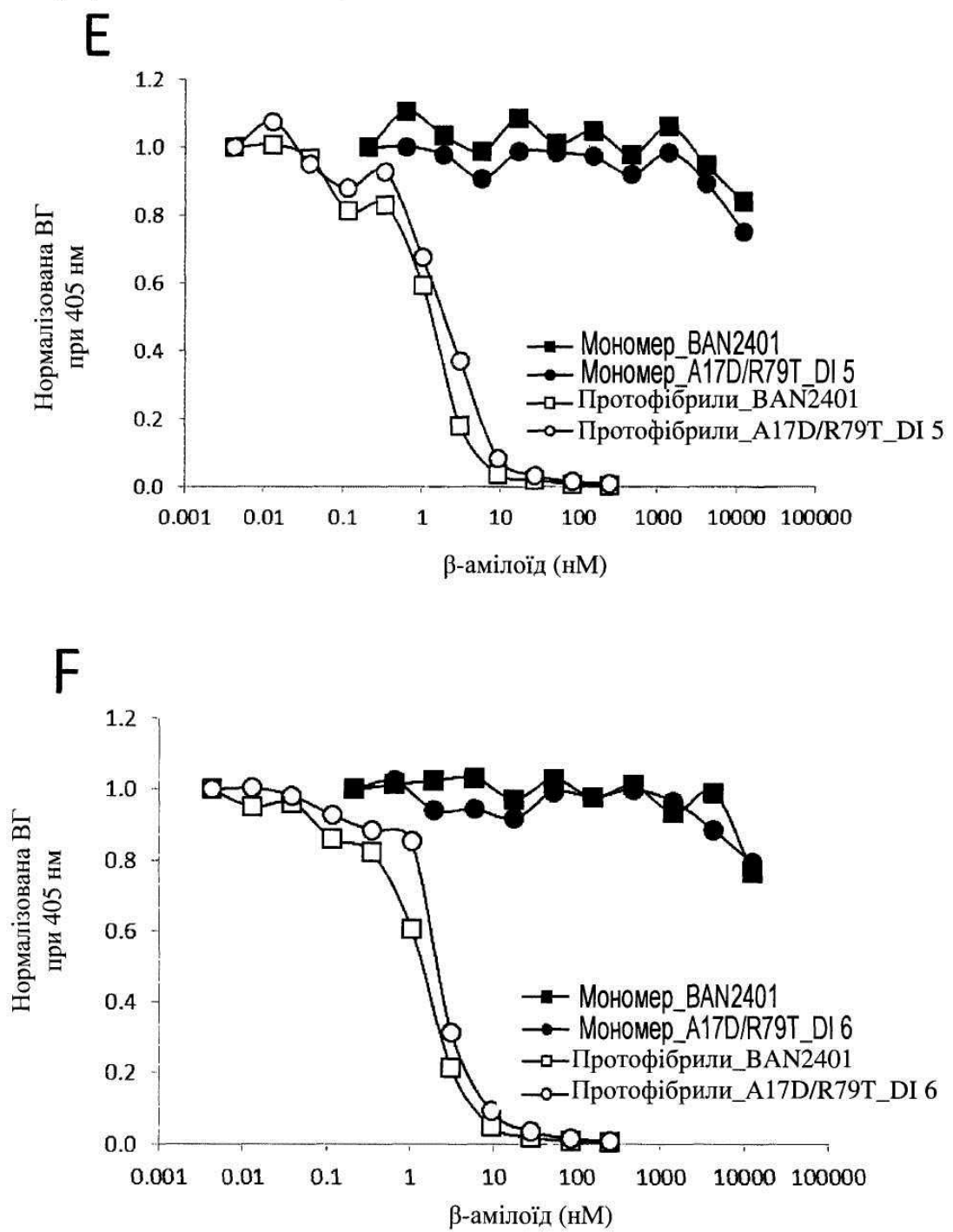
Фіг. 3



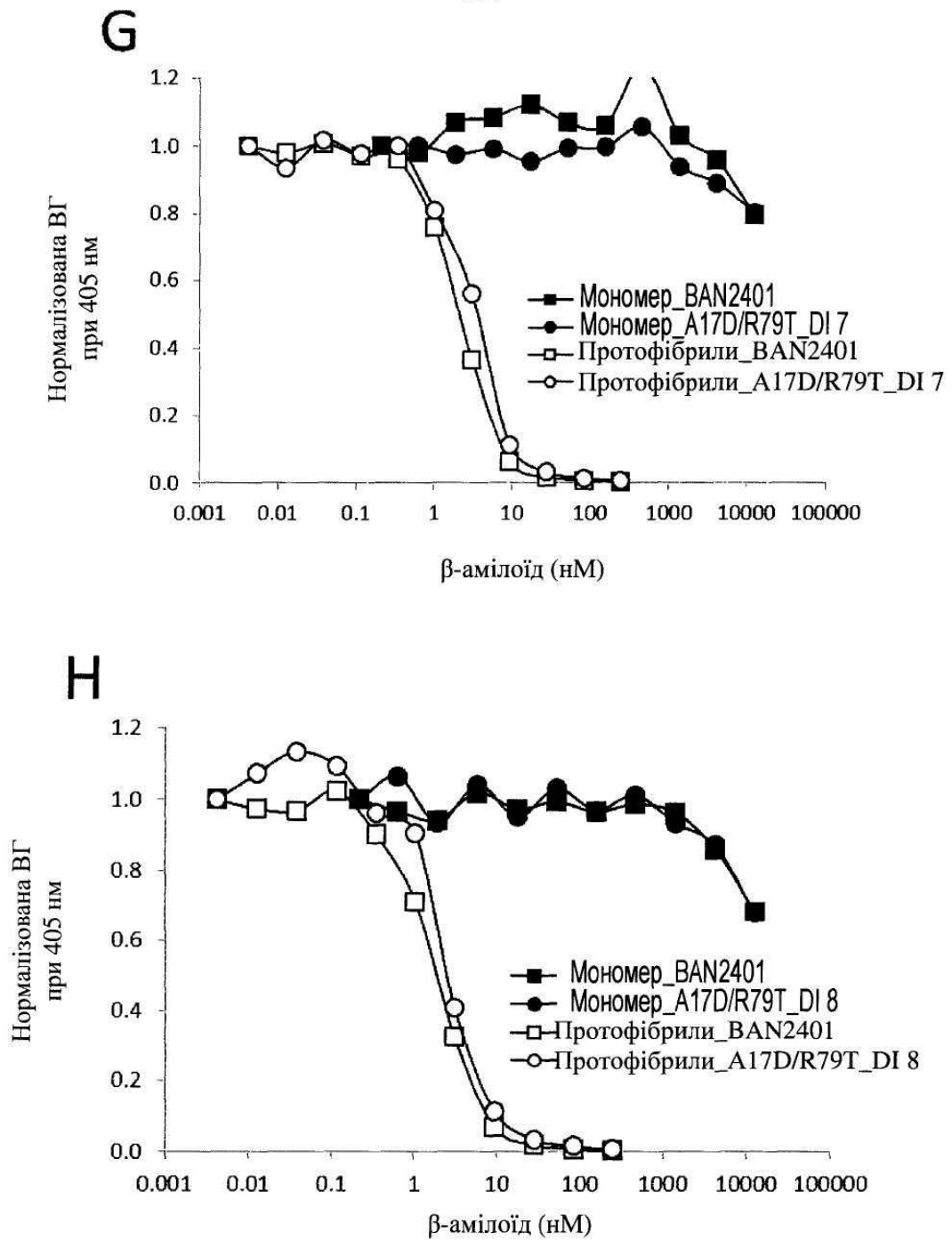
Фіг. 4



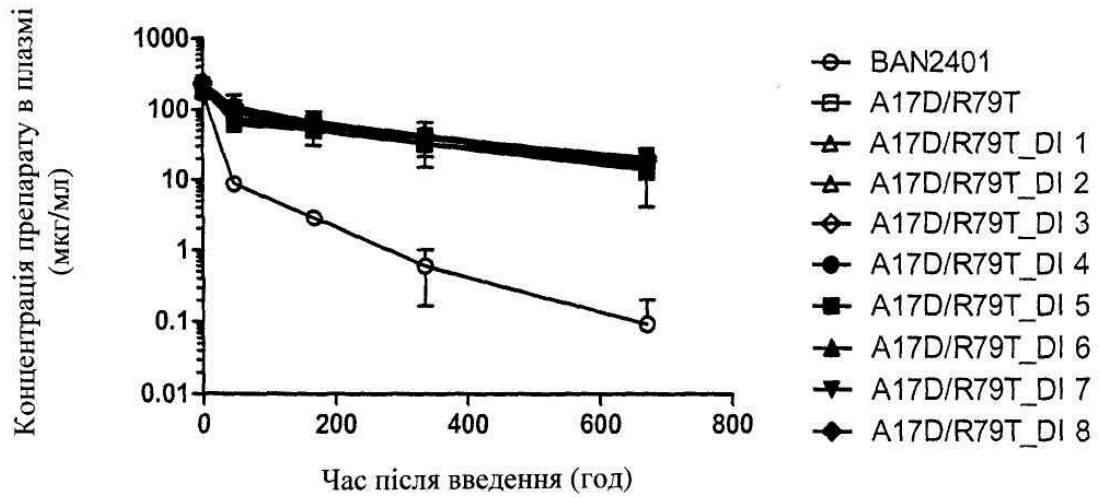
Фіг. 4 (продовження)



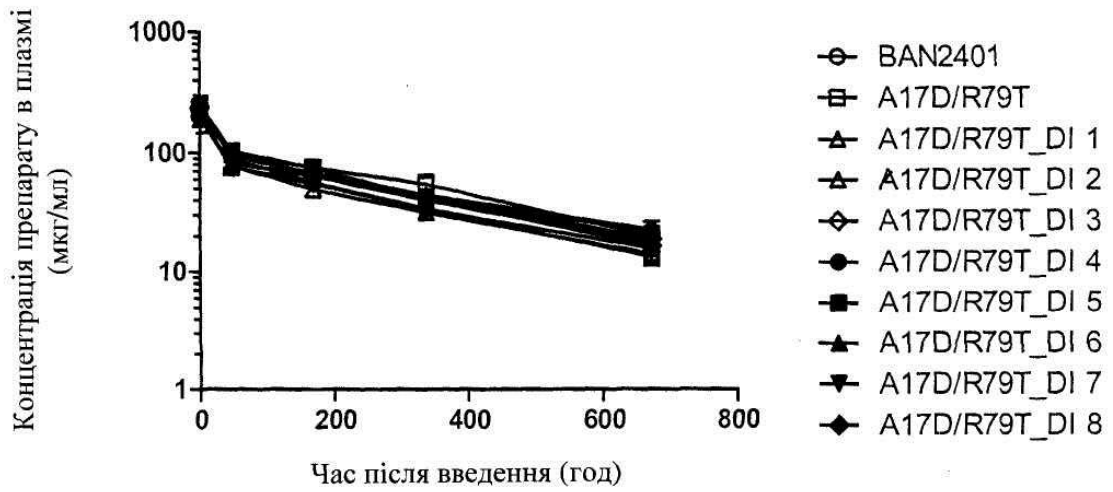
Фіг. 4 (продовження)



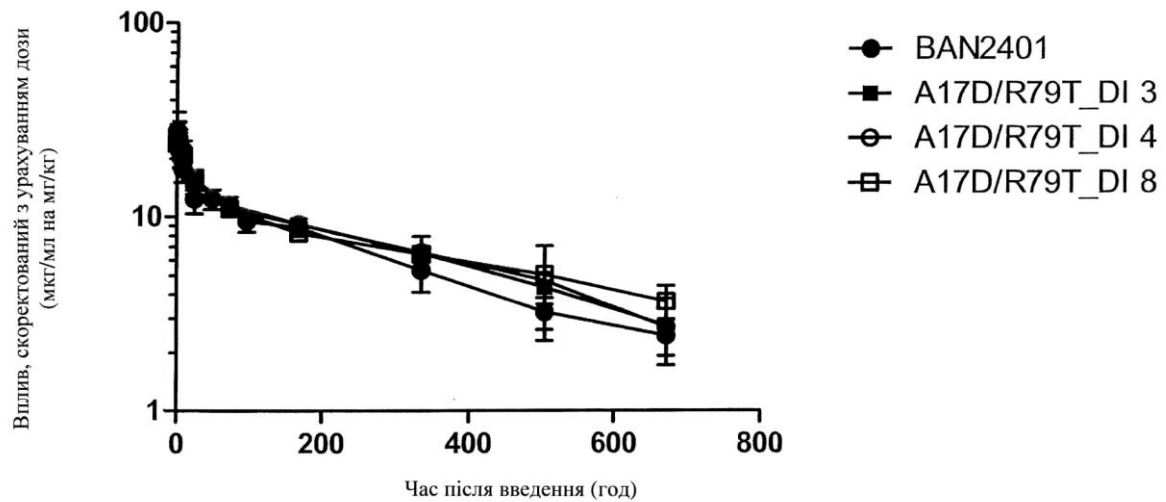
Фіг. 4 (продовження)



Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

Амінокислотні послідовності

SEQ ID NO 1: SFGMH
 SEQ ID NO 2: YISSGSSTIY YGDTVKG
 SEQ ID NO 3: EGGYYVGRSY YTMDY
 SEQ ID NO 4: RSSQSIVHSN GNTYLE
 SEQ ID NO 5: KVSNNRFS
 SEQ ID NO 6: FQGSHPVPT
 SEQ ID NO 7: DVVMTQSPLS LPVTPGAPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHVP
 SEQ ID NO 8: DVVMTQSPLS LPY₁TPGX₁PAS Y₂SCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLX₂I Y₃X₃VY₄AEDVGI
 SEQ ID NO 9: DVVMTQSPLS LPVTPGDPAS VSCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI QRVEAEDVGI YYCFQGSHVP
 SEQ ID NO 10: DVVMTQSPLS LPVTPGDPAS VSCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI SRVEAEDVGI YYCFQGSHVP
 SEQ ID NO 11: DVVMTQSPLS LPATPGDPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI QRVEAEDVGI YYCFQGSHVP
 SEQ ID NO 12: DVVMTQSPLS LPATPGDPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI SRVEAEDVGI YYCFQGSHVP
 SEQ ID NO 13: EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCSASGFTFS SFGMHVWRQA PGKLEWVAY ISSGSSTIYY GDTVKGRTI SRDIAKNSLF LQMSSSLRAED TAVYYCAREG
 SEQ ID NO 14: EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCSASGFTFS SFGMHVZ₁Z₂Z₃ PGKLEWVAY ISSGSSTIYY GDTVKGRTI SRDIAKNSLF LQMSSSLRAED TAVYYCAREG
 SEQ ID NO 15: EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCSASGFTFS SFGMHVWRQA PGKLEWVAY ISSGSSTIYY GDTVKGRTI SRDIAKNSLF LQMSSSLRAED TAVYYCAREG
 SEQ ID NO 16: EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCSASGFTFS SFGMHVWRQT PGKLEWVAY ISSGSSTIYY GDTVKGRTI SRDIAKNSLF LQMSSSLRAED TAVYYCAREG
 SEQ ID NO 17: EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCSASGFTFS SFGMHVWQA PGKLEWVAY ISSGSSTIYY GDTVKGRTI SRDIAKNSLF LQMSSSLRAED TAVYYCAREG
 SEQ ID NO 18: EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCSASGFTFS SFGMHVIRQA PGKLEWVAY ISSGSSTIYY GDTVKGRTI SRDIAKNSLF LQMSSSLRAED TAVYYCAREG
 SEQ ID NO 19: DVVMTQSPLS LPVTPGDPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHVP
 SEQ ID NO 20: DVVMTQSPLS LPVTPGDPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI SRVEAEDVGI YYCFQGSHVP

Фіг. 8

SEQ ID NO 21: DVVMTQSPLS LPVTPGDPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI SSVEAEDVGI YYCFQGSHVP
 SEQ ID NO 22: DVVMTQSPLS LPVTPGDPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLRI SSVEAEDVGI YYCFQGSHVP
 SEQ ID NO 23: ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSVVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVFP
 KSCDTHITCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTILMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFPYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFCSCV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
 SEQ ID NO 24: RTVAAPSVFI PPPSDPEQLKS GTASVVCLIN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVACEVT HQGLSSPVTK
 SFNRGEC

Фіг. 8 (продовження)

| Нумерація | | 1 | | | | | | | | | | 2 | | | | | | | | | | 3 | | | | | | | | | | 4 | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Кебота | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | | | | | | | | | | |
| N-кінцева нумерація: | | 1 | | | | | | | | | | 2 | | | | | | | | | | 3 | | | | | | | | | | 4 | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | | | | | | | | | |
| BAN2401 | | D | V | V | M | T | Q | S | P | L | S | L | P | V | T | P | G | A | P | A | S | I | S | C | R | S | S | Q | S | I | V | H | S | N | G | N | T | Y | L | E | W | Y | L | Q | K | P | G | Q | S | P | K | L | L | I | Y | K | V | S | N |
| Антитіла даного винаходу | | D | V | V | M | T | Q | S | P | L | S | L | P | V | T | P | G | X1 | P | A | S | Y2 | S | C | R | S | S | Q | S | I | V | H | S | N | G | N | T | Y | L | E | W | Y | L | Q | K | P | G | Q | S | P | K | L | L | I | Y | K | V | S | N |
| i) | | D | V | V | M | T | Q | S | P | L | S | L | P | V | T | P | G | D | P | A | S | V | 3 | C | R | S | S | Q | S | I | V | H | S | N | G | N | T | Y | L | E | W | Y | L | Q | K | P | G | Q | S | P | K | L | L | I | Y | K | V | S | N |
| ii) | | D | V | V | M | T | Q | S | P | L | S | L | P | V | T | P | G | D | P | A | S | V | 4 | C | R | S | S | Q | S | I | V | H | S | N | G | N | T | Y | L | E | W | Y | L | Q | K | P | G | Q | S | P | K | L | L | I | Y | K | V | S | N |
| iii) | | D | V | V | M | T | Q | S | P | L | S | L | P | A | T | P | G | D | P | A | S | I | 5 | C | R | S | S | Q | S | I | V | H | S | N | G | N | T | Y | L | E | W | Y | L | Q | K | P | G | Q | S | P | K | L | L | I | Y | K | V | S | N |
| iv) | | D | V | V | M | T | Q | S | P | L | S | L | P | A | T | P | G | D | P | A | S | I | 6 | C | R | S | S | Q | S | I | V | H | S | N | G | N | T | Y | L | E | W | Y | L | Q | K | P | G | Q | S | P | K | L | L | I | Y | K | V | S | N |

Фіг. 9

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|----|----|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|---|--|--|--|--|--|--|--|
| Нумерація | 6 | | | | | | | | | | 7 | | | | | | | | | | 8 | | | | | | | | | | 9 | | | | | | | | | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Кебота | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N-кінцева | 6 | | | | | | | | | | 7 | | | | | | | | | | 8 | | | | | | | | | | 9 | | | | | | | | | | 10 | | | | | | | | | | 11 | | | | | | | | | |
| нумерація | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BAN2401 | F | S | G | V | P | D | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | R | I | 5 | R | V | E | A | E | D | V | G | I | Y | Y | C | F | Q | G | S | H | V | P | P | T | F | G | P | G | T | K | L | E | I | K | | | | | | | |
| Антитіла даного винаходу | F | S | G | V | P | D | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | X2 | I | Y3 | X3 | V | Y4 | A | E | D | V | G | I | Y | Y | C | F | Q | G | S | H | V | P | P | T | F | G | P | G | T | K | L | E | I | K | | | | | | | |
| i) | F | S | G | V | P | D | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | Q | R | V | E | A | E | D | V | G | I | Y | Y | C | F | Q | G | S | H | V | P | P | T | F | G | P | G | T | K | L | E | I | K | | | | | | | |
| ii) | F | S | G | V | P | D | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | 5 | R | V | D | A | E | D | V | G | I | Y | Y | C | F | Q | G | S | H | V | P | P | T | F | G | P | G | T | K | L | E | I | K | | | | | | | |
| iii) | F | S | G | V | P | D | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | Q | R | V | E | A | E | D | V | G | I | Y | Y | C | F | Q | G | S | H | V | P | P | T | F | G | P | G | T | K | L | E | I | K | | | | | | | |
| iv) | F | S | G | V | P | D | R | F | S | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T | I | 5 | R | V | D | A | E | D | V | G | I | Y | Y | C | F | Q | G | S | H | V | P | P | T | F | G | P | G | T | K | L | E | I | K | | | | | | | |

Фіг. 9 (продовження)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Нумерація | 1 | | | | | | | | | | 2 | | | | | | | | | | 3 | | | | | | | | | | 4 | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Кебота | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
| N-кінцева нумерація ₁ | 1 | | | | | | | | | | 2 | | | | | | | | | | 3 | | | | | | | | | | 4 | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | |
| BAN2401 | E | V | Q | L | V | E | S | G | G | G | L | V | Q | P | G | G | S | L | R | L | S | C | S | A | S | G | F | T | F | S | S | F | G | M | H | W | V | R | Q | A | P | G | K | G | L | E | W | V | A | Y | I | S | S | G | S | S | T | I | Y | |
| Антитіла даного винаходу | E | V | Q | L | V | E | S | G | G | G | L | V | Q | P | G | G | S | L | R | L | S | C | S | A | S | G | F | T | F | S | S | F | G | M | H | W | Z | 2 | Q | 2 | 3 | P | G | K | G | L | E | W | V | A | Y | I | S | S | G | S | S | T | I | Y |
| i) | E | V | Q | L | V | E | S | G | G | G | L | V | Q | P | G | G | S | L | R | L | S | C | S | A | S | G | F | T | F | S | S | F | G | M | H | W | V | R | Q | N | P | G | K | G | L | E | W | V | A | Y | I | S | S | G | S | S | T | I | Y | |
| ii) | E | V | Q | L | V | E | S | G | G | G | L | V | Q | P | G | G | S | L | R | L | S | C | S | A | S | G | F | T | F | S | S | F | G | M | H | W | V | R | Q | T | P | G | K | G | L | E | W | V | A | Y | I | S | S | G | S | S | T | I | Y | |
| iii) | E | V | Q | L | V | E | S | G | G | G | L | V | Q | P | G | G | S | L | R | L | S | C | S | A | S | G | F | T | F | S | S | F | G | M | H | W | V | Q | Q | A | P | G | K | G | L | E | W | V | A | Y | I | S | S | G | S | S | T | I | Y | |
| iv) | E | V | Q | L | V | E | S | G | G | G | L | V | Q | P | G | G | S | L | R | L | S | C | S | A | S | G | F | T | F | S | S | F | G | M | H | W | I | R | Q | A | P | G | K | G | L | E | W | V | A | Y | I | S | S | G | S | S | T | I | Y | |

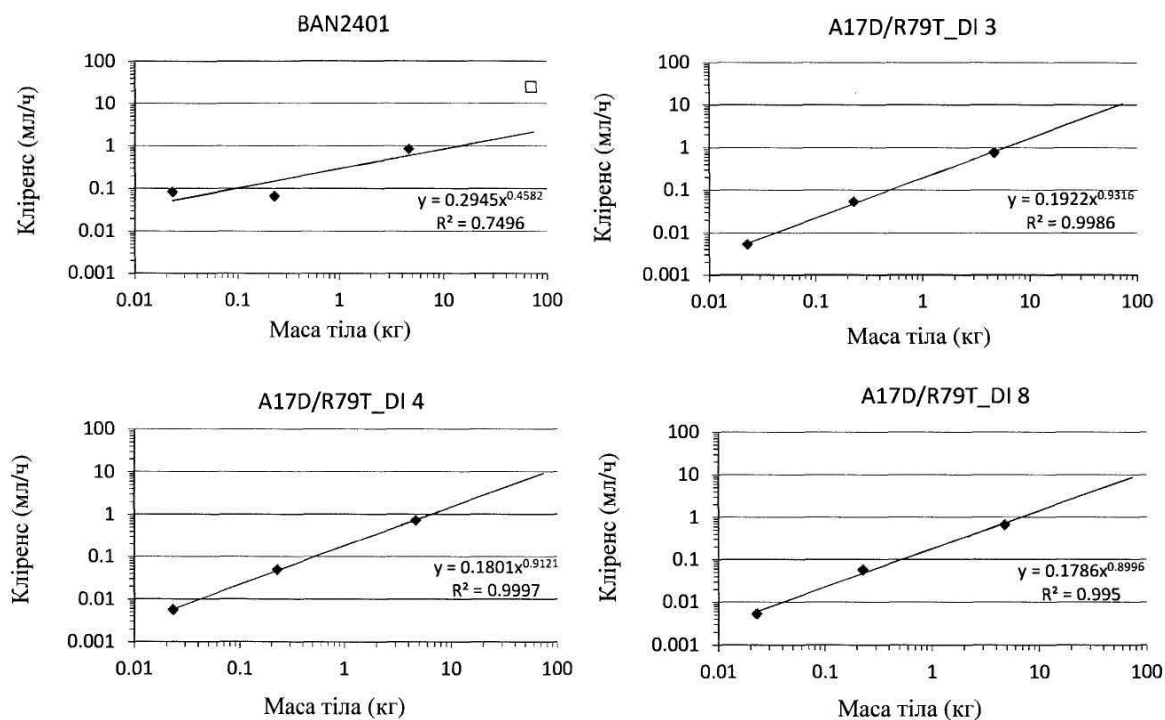
Фіг. 10

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|---|---|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Нумерація | 6 | | | | | | 7 | | | | | | 8 | | | | | | 9 | | | | | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Кебота | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | A | B | C | D | E | F | v | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | | | | | | | | | | |
| N-кінцева нумерація | 6 | | | | | | 7 | | | | | | 8 | | | | | | 9 | | | | | | 10 | | | | | | 11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | | | | | | | | |
| BAN2401 | Y | G | D | T | V | K | G | R | F | T | I | S | R | D | N | A | K | N | S | L | F | L | Q | M | S | S | L | R | A | E | D | T | A | V | Y | Y | C | A | R | E | G | G | Y | Y | Y | G | R | S | Y | Y | T | M | D | Y | W | G | Q |
| Антитіла даного винаходу | Y | G | D | T | V | K | G | R | F | T | I | S | R | D | N | A | K | N | S | L | F | L | Q | M | S | S | L | R | A | E | D | T | A | V | Y | Y | C | A | R | E | G | G | Y | Y | Y | G | R | S | Y | Y | T | M | D | Y | W | G | Q |
| i) | Y | G | D | T | V | K | G | R | F | T | I | S | R | D | N | A | K | N | S | L | F | L | Q | M | S | S | L | R | A | E | D | T | A | V | Y | Y | C | A | R | E | G | G | Y | Y | Y | G | R | S | Y | Y | T | M | D | Y | W | G | Q |
| ii) | Y | G | D | T | V | K | G | R | F | T | I | S | R | D | N | A | K | N | S | L | F | L | Q | M | S | S | L | R | A | E | D | T | A | V | Y | Y | C | A | R | E | G | G | Y | Y | Y | G | R | S | Y | Y | T | M | D | Y | W | G | Q |
| iii) | Y | G | D | T | V | K | G | R | F | T | I | S | R | D | N | A | K | N | S | L | F | L | Q | M | S | S | L | R | A | E | D | T | A | V | Y | Y | C | A | R | E | G | G | Y | Y | Y | G | R | S | Y | Y | T | M | D | Y | W | G | Q |
| iv) | Y | G | D | T | V | K | G | R | F | T | I | S | R | D | N | A | K | N | S | L | F | L | Q | M | S | S | L | R | A | E | D | T | A | V | Y | Y | C | A | R | E | G | G | Y | Y | Y | G | R | S | Y | Y | T | M | D | Y | W | G | Q |

Фіг. 10 (продовження)

| | | | | | | | |
|--------------------------|----|---|---|---|---|---|-----|
| Нумерація | 11 | | | | | | |
| Кебота | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 3 |
| N-кінцева нумерація | 12 | | | | | | |
| | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 4 |
| BAN2401 | G | T | T | V | T | V | S S |
| Антитіла даного винаходу | G | T | T | V | T | V | S S |
| i) | G | T | T | V | T | V | S S |
| ii) | G | T | T | V | T | V | S S |
| iii) | G | T | T | V | T | V | S S |
| iv) | G | T | T | V | T | V | S S |

Фіг. 10 (продовження)



Фіг. 11

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601