



УКРАЇНА

(19) **UA**(11) **128383**(13) **C2**

(51) МПК

C07K 16/18 (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 25/28** (2006.01)

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

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2019 07321	(72) Винахідник(и): Адольфссон Оскар (CH), Хоцел Ісідро (US), Дікара Даніелль (US)
(22) Дата подання заявки: 06.12.2017	(73) Володілець (володільці): ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080, United States of America (US), АЦ ІММУНЕ СА, EPFL Innovation Park, Building B, CH-1015 Lausanne, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 04.07.2024	(74) Представник: Бреус Наталія Володимирівна, реєстр. №167
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/431,180	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2012/045882 A2, 12.04.2012 WO 2013/050567 A1, 11, 04.2013 WO 2013/096380 A2, 27.06.2013 WO 2013/151762 A1, 10.10.2013 WO 2014/028777 A2, 20.02.2014 WO 2015/200806 A2, 30.12.2015 WO 2016/196726 A1, 08.12.2016 ESTEVE-S-VILLSNUEVA JOSE O., MARTIC- MILNE SANELA. Electrochemical detection of anti-tau antibodies binding to tau protein and inhibition of GSK-3[beta]-catalyzed phosphorylation. Analytical biochemistry. 17.12.2015. Vol. 496. P. 55 – 62 URL: http: // DOI: 10.1016/j.ab.2015.12.002 Characterization of Prefibrillar Tau Oligomers in Vitro and in Alzheimer Disease / Patterson K. R. et al. / Journal of biological chemistry. 01.07.2011. Vol. 286. No. 26. P. 23063 – 23076
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 07.12.2016	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.10.2019, Бюл.№ 20	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 03.07.2024, Бюл.№ 27	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2017/064869, 06.12.2017	

(54) АНТИТІЛО ДО ТАУ-БІЛКА ТА СПОСІБ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**(57)** Реферат:

Винахід стосується антитіла до тау-білка та способу його застосування.

UA 128383 C2

Дана заявка претендує на пріоритет за попередньою заявкою США № 62/431,180, поданою 7 грудня 2016 року, яка включена у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті для будь-яких цілей.

Область техніки, до якої відноситься винахід

5 Даний винахід відноситься до антитіл проти тау-білка та способів їх застосування.

Рівень техніки

Нейрофібрилярні клубки і нейропільні нитки (NT) є основними нейропатологічними ознаками хвороби Альцгеймера (AD). NT складаються з асоційованого з мікротрубочками тау-білка (Тау), який підданий посттрансляційним модифікаціям, у тому числі фосфорилюванню, і утвореному за рахунок агрегації гіперфосфорилованих конформерів тау-білка. Дана патологія є загальною для хвороби Альцгеймера та багатьох нейродегенеративних таупатій, зокрема, для деяких типів лобово-скроневої деменції (FTD). Тау-білок, очевидно, відіграє найважливішу роль у вгасанні когнітивних здатностей при ХА та подібних нейродегенеративних таупатіях.

15 Терапевтичні підходи, спрямовані на тау-білок, нечисленні та в основному включають застосування інгібіторів кіназ, які, як вважається, підсилюють фосфорилювання тау-білка до патологічних рівнів, і сполук, що блокують агрегацію гіперфосфорилизованого тау-білка у цитоплазмі. Ці підходи характеризуються різними недоліками з погляду специфічності й ефективності. Існує потреба в додаткових терапевтичних агентах, що впливають на патологічні конформери тау-білка, які свідомо або приблизно викликають нейродегенеративні розлади.

20 Сутність винаходу

Відповідно до даного винаходу запропоновані антитіла проти тау-білка та способи їх застосування. У деяких варіантах реалізації запропоновані антитіла з високою спорідненістю для тау-білка людини або яванського макака. У деяких варіантах реалізації антитіла мають спорідненість для тау-білка людини, що становить менше 1 нМ або менше 0,5 нМ, або менше 0,3 нМ, як виміряно, наприклад, за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

25 У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло зв'язується з мономерним тау-білком, олігомерним тау-білком, нефосфорилованим тау-білком і фосфорилованим тау-білком. У деяких варіантах реалізації антитіло зв'язує епітоп у межах амінокислот 2-24 зрілого тау-білка людини. У деяких варіантах реалізації антитіло являє собою моноклональне антитіло. У деяких варіантах реалізації антитіло є антитілом людини, гуманізованим або химерним антитілом. У деяких варіантах реалізації антитіло являє собою фрагмент антитіла, що зв'язує тау-білок людини. У деяких варіантах реалізації тау-білок людини містить послідовність SEQ ID NO:2.

30 У деяких варіантах реалізації антитіло містить HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:605; HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:606; і HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:607.

35 У деяких варіантах реалізації антитіло містить HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:608; HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:609; і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:610.

40 У деяких варіантах реалізації антитіло містить HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:605; HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:606; і HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:607; HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:608; HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:609; і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:610.

45 У деяких варіантах реалізації антитіло містить:

а) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:603;

б) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:604;

50 в) VH згідно з варіантом (а) і VL згідно з варіантом (б);

д) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:614;

е) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:615;

55 ф) VH згідно з варіантом (д) і VL згідно з варіантом (е);

г) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:619;

х) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:620;

60 і) VH згідно з варіантом (г) і VL згідно з варіантом (х).

містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:617, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:618. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:616 або SEQ ID NO:617, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:618. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:616, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:618. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:617, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:618.

У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:621 або SEQ ID NO:622, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:623. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:621, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:623. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:622, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:623. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:621 або SEQ ID NO:622, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:623. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:621, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:623. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:622, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:623.

У будь-якому з варіантів реалізації, описаних у даному документі, антитіло може бути антитілом IgG1 або IgG4. У будь-якому з варіантів реалізації, описаних у даному документі, антитіло може бути антитілом IgG4. У деяких із таких варіантів реалізації антитіло містить мутації M252Y, S254T і T256E. У будь-якому з варіантів реалізації, описаних у даному документі, антитіло може містити мутацію S228P. У будь-якому з варіантів реалізації, описаних у даному документі, антитіло може містити мутації S228P, M252Y, S254T і T256E. У будь-якому з варіантів реалізації, описаних у даному документі, антитіло може бути антитілом IgG4, що містить мутації S228P, M252Y, S254T і T256E. У деяких варіантах реалізації антитіло являє собою фрагмент антитіла. У будь-якому з варіантів реалізації, описаних у даному документі, антитіло може бути антитілом IgG4, що містить мутації S228P, M252Y, S254T і T256E і не містить С-кінцевого залишку лізину (des-K) константної області важкого ланцюга. Даний С-кінцевий лізин константної області важкого ланцюга може бути вилучений, наприклад, під час очищення антитіла або за допомогою рекомбінантного конструювання нуклеїнової кислоти, що кодує дане антитіло таким чином, що С-кінцевий лізин не кодується.

У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло зв'язується з мономерним тау-білком, фосфорилованим тау-білком, нефосфорилованим тау-білком й олігомерним тау-білком з K_D менше 100 нМ, менше 75 нМ, менше 50 нМ, менше 10 нМ, менше 5 нМ або менше 1 нМ. У деяких варіантах реалізації антитіло зв'язує тау-білок яванського макака. У деяких варіантах реалізації антитіло зв'язується з мономерним тау-білком людини і/або мономерним тау-білком яванського макака з K_D менше 1 нМ.

У деяких варіантах реалізації запропонована виділена нуклеїнова кислота, причому зазначена виділена нуклеїнова кислота кодує антитіло, описане у даному документі. У деяких варіантах реалізації запропонована клітина-хазяїн, що містить виділену нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, описане у даному документі. У деяких варіантах реалізації запропонований спосіб одержання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна в умовах, що підходять для продукування зазначеного антитіла.

У деяких варіантах реалізації запропонований імунокон'югат, що містить виділене антитіло, описане у даному документі, і терапевтичний агент. У деяких варіантах реалізації запропонований імунокон'югат, що містить антитіло, описане у даному документі, і мітку, що виявляється.

5 У деяких варіантах реалізації запропонована фармацевтична композиція, що містить виділене антитіло, описане у даному документі, і фармацевтично прийнятний носій.

У деяких варіантах реалізації запропонований спосіб лікування захворювання, асоційованого з тау-білком, який включає введення індивіду із захворюванням, асоційованим з тау-білком, антитіла, описаного у даному документі, або фармацевтичної композиції, що містить антитіло, описане у даному документі. У деяких варіантах реалізації захворювання, асоційоване з тау-білком, являє собою таупатію. У деяких варіантах реалізації таупатія являє собою нейродегенеративну таупатію. У деяких варіантах реалізації таупатія вибрана з хвороби Альцгеймера, бічного аміотрофічного склерозу, хвороби Паркінсона, хвороби Крейтцфельда-Якоба, деменції боксерів, синдрому Дауна, хвороби Герстманна-Штреуслера-Шейнкера, міозиту з включеними тільцями, пріон-протеїноцеребральної амілоїдної ангіопатії, черепно-мозкової травми, бічного аміотрофічного склерозу/комбінації паркінсонізму та деменції (комплексу Гуама), негуамської хвороби рухового нейрона з нейрофібрилярними клубками, деменції аргірофільних зерен, кортикобазальної дегенерації, дифузійних нейрофібрилярних клубків з кальцифікацією, лобово-скроневої деменції, лобово-скроневої деменції з паркінсонізмом, зчепленої з 17 хромосомою, хвороби Галервордена-Шпатца, множинної системної атрофії, хвороби Німанна-Піка типу С, палідо-пonto-нігральної дегенерації, хвороби Піка, прогресуючого субкортикального гліозу, прогресуючого над'ядерного паралічу, підгострого склерозуючого паненцефаліту, деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, постенцефалітичного паркінсонізму та міотонічної дистрофії. У деяких варіантах реалізації таупатія являє собою хворобу Альцгеймера або прогресуючий над'ядерний параліч. У деяких варіантах реалізації захворювання, яке асоційоване з тау-білком, вибране з ПБТ (первинної вікової таупатії), деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, підгострої склерозуючої паненцефалопатії, хронічної травматичної енцефалопатії (ХТЕ), таупатії білої речовини з включеннями кулькоподібних гліалів, деменції з тільцями Леві (ДТЛ), легкого когнітивного порушення (ЛКП), глаукоми, сімейної британської деменції, сімейної датської деменції, гваделупського паркінсонізму, нейродегенерації з відкладенням заліза в головному мозку, SLC9A6-пов'язаної розумової відсталості, множинного склерозу, ВІЛ-пов'язаної деменції, старечого амілоїдозу серця та хвороби Гантінгтона.

У деяких варіантах реалізації запропонований спосіб збереження або підвищення ємності когнітивної пам'яті або вповільнення втрати пам'яті в індивіда, який включає введення антитіла, описаного у даному документі, або фармацевтичної композиції, що містить антитіло, описане у даному документі.

У деяких варіантах реалізації запропонований спосіб зниження рівня тау-білка, нефосфорилованого тау-білка, фосфорилованого тау-білка або гіперфосфорилованого тау-білка в індивіда, який включає введення антитіла, описаного у даному документі, або фармацевтичної композиції, що містить антитіло, описане у даному документі.

У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, описане у даному документі, для застосування як лікарський засіб. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, описане у даному документі, для застосування при лікуванні таупатії в індивіда. У деяких варіантах реалізації таупатія являє собою нейродегенеративну таупатію. У деяких варіантах реалізації таупатія вибрана з хвороби Альцгеймера, бічного аміотрофічного склерозу, хвороби Паркінсона, хвороби Крейтцфельда-Якоба, деменції боксерів, синдрому Дауна, хвороби Герстманна-Штреуслера-Шейнкера, міозиту з включеними тільцями, пріон-протеїноцеребральної амілоїдної ангіопатії, черепно-мозкової травми, бічного аміотрофічного склерозу/комбінації паркінсонізму та деменції (комплексу Гуама), негуамської хвороби рухового нейрона з нейрофібрилярними клубками, деменції аргірофільних зерен, кортикобазальної дегенерації, дифузійних нейрофібрилярних клубків з кальцифікацією, лобово-скроневої деменції, лобово-скроневої деменції з паркінсонізмом, зчепленої з 17 хромосомою, хвороби Галервордена-Шпатца, множинної системної атрофії, хвороби Німанна-Піка типу С, палідо-пonto-нігральної дегенерації, хвороби Піка, прогресуючого субкортикального гліозу, прогресуючого над'ядерного паралічу, підгострого склерозуючого паненцефаліту, деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, постенцефалітичного паркінсонізму та міотонічної дистрофії. У деяких варіантах реалізації таупатія являє собою хворобу Альцгеймера або прогресуючий над'ядерний параліч. У деяких варіантах реалізації захворювання, яке асоційоване з тау-білком, вибране з ПБТ (первинної вікової таупатії), деменції з перевагою

нейрофібрилярних клубків, підгострої склерозуючої паненцефалопатії, хронічної травматичної енцефалопатії (ХТЕ), таупатії білої речовини з включеннями кулькоподібних гліалів, деменції з тільцями Леві (ДТЛ), легкого когнітивного порушення (ЛКП), глаукоми, сімейної британської деменції, сімейної датської деменції, гваделупського паркінсонізму, нейродегенерації з відкладенням заліза в головному мозку, SLC9A6-пов'язаної розумової відсталості, множинного склерозу, ВІЛ-пов'язаної деменції, старечого амілоїдозу серця та хвороби Гантінгтона.

У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, описане у даному документі, для застосування при збереженні або підвищенні ємності когнітивної пам'яті або вповільненні втрати пам'яті в індивіда. У деяких варіантах реалізації антитіло, описане у даному документі, запропоноване для застосування при зниженні рівня тау-білка, нефосфорилизованого тау-білка, фосфорилизованого тау-білка або гіперфосфорилизованого тау-білка в індивіда.

У деяких варіантах реалізації виділене антитіло, описане у даному документі, запропоноване для одержання лікарського засобу для лікування захворювання, асоційованого з тау-білком, в індивіда. У деяких варіантах реалізації захворювання, асоційоване з тау-білком, являє собою таупатію. У деяких варіантах реалізації таупатія являє собою нейродегенеративну таупатію. У деяких варіантах реалізації таупатію вибирають з хвороби Альцгеймера, бічного аміотрофічного склерозу, хвороби Паркінсона, хвороби Крейтцфельда-Якоба, деменції боксерів, синдрому Дауна, хвороби Герстманна-Штреуслера-Шейнкера, міозиту з включеними тільцями, пріон-протеїнцеребральної амілоїдної ангіопатії, черепно-мозкової травми, бічного аміотрофічного склерозу/комбінації паркінсонізму та деменції (комплексу Гуама), негуамської хвороби рухового нейрона з нейрофібрилярними клубками, деменції аргірофільних зерен, кортикобазальної дегенерації, дифузійних нейрофібрилярних клубків з кальцифікацією, лобово-скроневої деменції, лобово-скроневої деменції з паркінсонізмом, зчепленої з 17 хромосомою, хвороби Галервордена-Шпатца, множинної системної атрофії, хвороби Німанна-Піка типу С, палідо-понтонігральної дегенерації, хвороби Піка, прогресуючого субкортикального гліозу, прогресуючого над'ядерного паралічу, підгострого склерозуючого паненцефаліту, деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, постенцефалітичного паркінсонізму та міотонічної дистрофії. У деяких варіантах реалізації таупатія являє собою хворобу Альцгеймера або прогресуючий над'ядерний параліч. У деяких варіантах реалізації захворювання, яке асоційоване з тау-білком, вибране з ПБТ (первинної вікової таупатії), деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, підгострої склерозуючої паненцефалопатії, хронічної травматичної енцефалопатії (ХТЕ), таупатії білої речовини з включеннями кулькоподібних гліалів, деменції з тільцями Леві (ДТЛ), легкого когнітивного порушення (ЛКП), глаукоми, сімейної британської деменції, сімейної датської деменції, гваделупського паркінсонізму, нейродегенерації з відкладенням заліза в головному мозку, SLC9A6-пов'язаної розумової відсталості, множинного склерозу, ВІЛ-пов'язаної деменції, старечого амілоїдозу серця та хвороби Гантінгтона.

У деяких варіантах реалізації запропоноване застосування антитіла, описаного у даному документі, для одержання лікарського засобу для збереження або підвищення ємності когнітивної пам'яті або вповільнення втрати пам'яті в індивіда.

У деяких варіантах реалізації запропонований спосіб виявлення нейрофібрилярних клубків, нейропільних ниток або дистрофічних нейритів, що включає контакт зразка з антитілом, описаним у даному документі. У деяких варіантах реалізації зразок може являти собою зразок головного мозку, зразок цереброспинальної рідини або зразок крові.

У будь-якому з варіантів реалізації, описаних у даному документі, спосіб або застосування може включати введення антитіла, описаного у даному документі, у комбінації з щонайменше одним додатковим терапевтичним засобом. Необмежуючі приклади інших терапевтичних засобів включають неврологічні лікарські засоби, кортикостероїди, антибіотики, противірусні засоби та інші терапевтичні агенти. Такі інші терапевтичні агенти включають інші антитіла проти тау-білка, антитіла проти бета-амілоїду, антитіла проти бета-секретази 1 ("BACE1") й інгібітори бета-секретази 1, але не обмежуються ними.

Короткий опис креслень

Фігура 1А-Е. Зв'язування антитіл з гіперфосфорилованим тау-білком (pTau) порівнювали з нефосфорилованим тау-білком за допомогою твердофазного ІФА. Результати виражали в одиницях оптичної щільності (O.D.).

Фігура 2А-Е. Зв'язування антитіл з олігомерним тау-білком оцінювали за допомогою твердофазного ІФА оліго- і мономерного тау-білка (monoTau). Результати виражали в одиницях оптичної щільності (O.D.).

Фігура 3. Три протестовані антитіла проти будь-якої форми тау-білка продемонстрували зв'язування розчинного тау-білка в лізатах головного мозку донорів із хворобою Альцгеймера (ХА) та відповідних контрольних донорів за допомогою аналізу на основі вестерн-блоттингу

(ВБ). Білкові екстракти лізатів головного мозку при ХА та контрольних лізатів, і шість ізоформ рекомбінантного тау-білка людини аналізували за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ і піддавали мембрани блоттингу з трьома антитілами проти будь-якої форми тау-білка (37D3-H9, 94B2-C1 і 125B11-H3). Доріжки зі зразками при ХА позначені як AD18, AD24 і AD27, а доріжки з контрольними зразками позначені як C25 і C21. Доріжки з шістьма ізоформами рекомбінантного тау-білка людини позначені як леддер hTau.

Фігура 4А-С. Антитіла проти будь-якої форми тау-білка продемонстрували зв'язування з розчинним тау-білком у лізатах головного мозку при ХА й у відповідних контрольних донорів за допомогою твердофазного ІФА із захопленням тау-білка. Представлені дані для трьох антитіл проти будь-якої форми тау-білка (37D3-H9, 94B2-C1 і 125B11-H3). Результати виражали в одиницях оптичної щільності (O.D.) у вигляді "середні значення $\pm$ СО", N=2.

Фігура 5. На сенсограмах показане зв'язування 37D3-H9 у формі Fab (лівий графік) і IgG (правий графік) з мономерним тау-білком людини, ковалентно зв'язаним із поверхнею чипа Віасоге. Використовували модель зв'язування 1:1, показану у вигляді накладення. По осі x позначений час (у секундах). По осі y позначені резонансні одиниці (РЕ).

Фігура 6. На накладених сенсограмах показане зв'язування зразків hu37D3-H9.v5 t=0 (лівий графік) і t=2 тижня (правий графік) з мономерним тау-білком людини в концентраціях 3,1, 6,3, 12,5, 25, 25, 50 і 100 нМ. Використовували модель зв'язування 1:1, також показану на цій фігурі. По осі x позначений час (у секундах). По осі y позначені резонансні одиниці (РЕ).

Фігура 7. Зв'язування hu37D3-H9.v5 і hu37D3-H9.v5 N28D з мономерним тау-білком окремо (на лівому графіку показаний hu37D3-H9.v5, а на середньому - hu37D3-H9.v5 N28D) і в суміші при співвідношенні 1:1 (правий графік). По осі x позначений час (у секундах). По осі y позначені резонансні одиниці (РЕ).

Фігура 8А-Д. Спорідненість, показник стабільності та послідовності дев'яноста варіантів 37D3-H9, що зазнали скринінгу на предмет можливого поліпшення стабільності. Для ясності значення, отримані з використанням контрольного антитіла, що не зазнав стресу (hu37D3-H9.v5 hlgG1), проаналізовані на початку, середині та кінці кожного експерименту, наведені в обох секціях таблиці.

Фігура 9. Структурна модель Fv-області 37D3-H9 з показаними положеннями залишків 28-33 (мотив NGNTYF) легкого ланцюга та відносними положеннями залишків 28 і 33. Зверніть увагу, що залишок 33, змтований в hu37D3.v28.A4 в Leu, не знаходиться поблизу від нестабільного залишку Asn-28. Точковою лінією показаний водневий зв'язок між залишками Asn-28 і Tyr-32. Фігура отримана за допомогою пакета програмного забезпечення MOE (Chemical Computing Group).

На Фігурі 10 показана фармакокінетика антитіла 37D3-H9 проти тау-білка в мишей після однократної внутрішньовенної або внутрішньочеревинної ін'єкції в дозуванні 10 мг/кг.

На Фігурі 11 показана фармакокінетика hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P і hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE в яванських макак після однократної в/в болюсної ін'єкції в дозі 1 мг/кг.

Фігура 12А-С. Зв'язування деяких антитіл проти тау-білка з фрагментами тау-білка. (А) Показане зв'язування деяких антитіл проти тау-білка з фрагментами тау-білка 1-15, 10-24, 19-33, 28-42, 37-51 і 46-60. (В) Зв'язування антитіла 37D3-H9 mlgG2a з фрагментами тау-білка 10-44, 10-24, 2-24, 2-34 і повнорозмірним тау-білком. (С) Зв'язування антитіла hu37D3-H9.v5 hlgG1 з фрагментами тау-білка 10-44, 10-24, 2-24, 2-34 і повнорозмірним тау-білком.

Фігура 13А-В. Вплив ефекторної функції на токсичність тау-білка в спільних культурах нейронів і мікроглії. (А) Відсоток фрагментації MAP2 у спільних культурах, що контактували з різними антитілами й олігомерним тау-білком. (В) Зображення нейронів (верхні графіки) і спільних культур нейронів і мікроглії (нижні графіки), які контактували з різними антитілами й олігомерним тау-білком.

Фігура 14. Рівні pTau212/214 у гіпокампі мишей після введення IgG2a проти тау-білка 37D3-H9 дикого типу або DANG IgG2 37D3-H9 проти тау-білка.

Фігура 15. Порівняння послідовностей тау-білка людини й яванського макака. Показаний епітоп антитіла 37D3-H9.

На Фігурі 16 показана фармакокінетика антитіла 94B2-C1 проти тау-білка в мишей після однократної внутрішньовенної або внутрішньочеревинної ін'єкції в дозуванні 10 мг/кг.

На Фігурі 17 показана фармакокінетика антитіла 125B11-H3 проти тау-білка в мишей після однократної внутрішньовенної або внутрішньочеревинної ін'єкції в дозуванні 10 мг/кг.

На Фігурі 18 показане вирівнювання варіабельних областей легких каппа 1-ланцюгів hu37D3-H9.v1, hu37D3-H9.v39, hu37D3-H9.v40 і hu37D3-H9.v41.

На Фігурі 19А-В показана концентрація антитіла у плазмі (А) і ЦСР (В) в яванських макак після однократної в/в ін'єкції зазначеного антитіла в дозуванні 50 мг/кг.

На Фігурі 20 показана концентрація загального тау-білка у плазмі та концентрація антитіла у плазмі яванських макак після однократної в/в ін'єкції зазначеного антитіла в дозуванні 50 мг/кг.

На Фігурах 21A-D показана концентрація антитіла в різних областях головного мозку яванського макака через 2 дні та 10 днів після однократної в/в ін'єкції hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P (A) і hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE (B) в дозуванні 50 мг/кг; середня концентрація антитіла в головному мозку (C); % концентрація антитіла в головному мозку:плазмі (D).

На Фігурі 22A-B показана концентрація антитіла в головному мозку яванського макака в різні моменти часу після однократної в/в ін'єкції зазначеного антитіла в дозуванні 50 мг/кг, представлена на графіку з логарифмічною (A) та лінійною (B) шкалою.

На Фігурі 23A-E показана концентрація антитіла в гіпокампі (A), мозочку (B), фронтальній корі (C), ЦСР (D) і плазмі (E) яванських макак у різні моменти часу після однократної в/в ін'єкції зазначеного антитіла в дозуванні 50 мг/кг.

На Фігурі 24A-B показані середня (A) й окремі (B) концентрації загального тау-білка у плазмі яванських макак залежно від часу після однократної в/в ін'єкції зазначеного антитіла в дозуванні 50 мг/кг.

На Фігурах 25A-B показане вирівнювання послідовностей між антитілами hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 і hu37D3-H9.v93 із дозрілою афінністю та батьківським антитілом hu37D3-H9.v28.A4. Відмінності між амінокислотами позначені чорним затіненням.

На Фігурах 26A-B показані вимірювання спорідненості hu37D3-H9.v76 для мономеру тау-білка людини (A) і мономеру тау-білка яванського макака (B).

Докладний опис варіантів реалізації винаходу

I. Визначення

"Акцепторний каркас людини" для цілей даного винаходу являє собою каркас, що містить амінокислотну послідовність каркаса варіабельного домена легкого ланцюга (VL) або каркаса варіабельного домена важкого ланцюга (VH), виділений з каркаса імуноглобуліну людини або консенсусної послідовності каркаса людини, як визначено нижче. Акцепторний каркас людини, "отриманий з" каркаса імуноглобуліну людини або консенсусної послідовності каркаса людини, може містити співпадаючу з ними амінокислотну послідовність або може містити зміни амінокислотної послідовності. У деяких варіантах реалізації кількість змін амінокислотної послідовності становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше або 2 або менше. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність VL-акцепторного каркаса людини ідентична послідовності VL-каркаса імуноглобуліну людини або консенсусної послідовності каркаса людини.

"Спорідненість" відноситься до сили суми нековалентних взаємодій між одиночним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитіла) та її партнера зі зв'язування (наприклад, антигена). Якщо не зазначено інше, у даному документі "спорідненість зв'язування" відноситься до властивості молекули спорідненості зв'язування, що відображає взаємодію між членами пари компонентів, що зв'язуються (наприклад, антитілом й антигеном) при їхньому співвідношенні 1:1. Спорідненість молекули X до її партнера Y у цілому можна виразити константою дисоціації (K_D). Спорідненість можна вимірювати за допомогою відомих в даній області техніки способів, у тому числі описаних у даному документі. Конкретні ілюстративні та типові варіанти реалізації вимірювання спорідненості зв'язування описані нижче.

Антитіло з "дозрілою афінністю" відноситься до антитіла з однією або більше змінами в одній або більше гіперваріабельних областях (HVR) у порівнянні з вихідним антитілом, яке не містить таких змін, причому такі зміни призводять до підвищення спорідненості антитіла до антигена.

Терміни "антитіло проти тау-білка" або "антитіло, що зв'язується з тау-білком" відносяться до антитіла, здатного зв'язувати тау-білок з достатньою спорідненістю, так що зазначене антитіло можна використовувати в якості діагностичного та/або терапевтичного агента при адресному впливі на тау-білок. У деяких варіантах реалізації ступінь зв'язування антитіла проти тау-білка з неспецифічним білком, що не є тау-білком, становить менше приблизно 10 % зв'язування антитіла з тау-білком при вимірюванні, наприклад, за допомогою радіоімуноаналізу (RIA). У деяких варіантах реалізації антитіло, що зв'язується з тау-білком, має константу дисоціації (K_D), що становить $\leq 1 \text{ мкМ}$, $\leq 100 \text{ нМ}$, $\leq 10 \text{ нМ}$, $\leq 1 \text{ нМ}$, $\leq 0,1 \text{ нМ}$, $\leq 0,01 \text{ нМ}$ або $\leq 0,001 \text{ нМ}$, (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М , наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М). У деяких варіантах реалізації антитіло проти тау-білка специфічно зв'язується з епітопом тау-білка, який є консервативним серед тау-білків різних видів тварин. Терміни "антитіло проти тау-білка" й "антитіло, що зв'язується з тау-білком" використовуються у даному документі взаємозамінно та відносяться до антитіла, що зв'язує мономерний тау-білок, олігомерний тау-білок і/або фосфорилований тау-білок, якщо інше не зазначено явно. У деяких варіантах

реалізації антитіло проти тау-білка зв'язується з мономерним тау-білком, олігомерним тау-білком, нефосфорилованим тау-білком і фосфорилованим тау-білком з порівнянною спорідненістю, наприклад, як при використанні антитіл, що відрізняються одне від одного не більше ніж у 50 разів. У деяких варіантах реалізації антитіло, що зв'язує мономерний тау-білок, олігомерний тау-білок, нефосфорилований тау-білок і фосфорилований тау-білок, називають "антитілом проти будь-якої форми тау-білка".

Термін "антитіло" у даному документі застосовується в самому широкому сенсі та включає різні структури антитіл, включаючи моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, поліспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) та фрагменти антитіл, за умови, що вони проявляють бажану антигензв'язуючу активність, але не обмежуються ними.

Термін "фрагмент антитіла" відноситься до молекули, яка не є інтактним антитілом, але містить фрагмент інтактного антитіла, що зв'язує антиген, з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіл включають Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, P(ab')₂-фрагменти; діатіла; лінійні антитіла; молекули одноланцюгових антитіл (наприклад, scFv); і поліспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл, але не обмежуються ними.

"Антитіло, яке зв'язується з тим самим епітопом", що й еталонне антитіло, відноситься до антитіла, яке блокує зв'язування еталонного антитіла з його антигеном при конкурентному аналізі на 50 % або більше, і, навпаки, еталонне антитіло блокує зв'язування антитіла з його антигеном при конкурентному аналізі на 50 % або більше. Типовий конкурентний аналіз наведений у даному документі.

Термін "химерне" антитіло відноситься до антитіла, в якому фрагмент важкого та/або легкого ланцюга походить з конкретного джерела або виду, у той час як інша частина важкого та/або легкого ланцюга походить з іншого джерела або виду.

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

У даному контексті термін "цитотоксичний агент" відноситься до речовини, яка інгібує або запобігає функціонуванню клітин і/або призводить до загибелі або руйнування клітин. Цитостатичні агенти включають радіоактивні ізотопи (наприклад, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² і радіоактивні ізотопи Lu), хіміотерапевтичні агенти або лікарські речовини (наприклад, метотрексат, адриаміцин, алкалоїди барвінку (вінкрисин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин С, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалюючі агенти); інгібітори росту; ферменти та їх фрагменти, наприклад, нуклеолітичні ферменти; антибіотики; токсини, наприклад, низькомолекулярні токсини або ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, включаючи їх фрагменти; і варіанти та різні протипухлинні або протиракові агенти, описані нижче, але не обмежуються ними.

Термін "ефекторні функції" відноситься до тих видів біологічної активності, що властиві Fc-області антитіла, які змінюються залежно від ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіл включають: зв'язування C1q і комплемент-залежну цитотоксичність (CDC); зв'язування з рецептором Fc; антитіло-залежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; придушення рецепторів поверхні клітини (наприклад, рецептора В-клітин); і активацію В-клітин.

"Ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичного складу, відноситься до кількості, ефективною в дозах і протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного терапевтичного або профілактичного результату.

У даному контексті термін "Fc-область" застосовується для позначення С-кінцевої області важкого ланцюга імуноглобуліну, який містить щонайменше фрагмент константної області. Термін включає Fc-області з нативними послідовностями і варіантні Fc-області. У деяких варіантах реалізації Fc-область важкого ланцюга IgG людини продовжується від Cys226 або від Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак Fc-область може містити або не містити С-кінцевий лізин (Lys447). Якщо не зазначено інше, нумерація амінокислотних залишків у Fc-області або константній області відповідає системі нумерації, прийнятій в ЕС, яку також називають ЕС-індексом, як описано у Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Термін "каркас" або "FR" відноситься до залишків варіабельного домена, за винятком залишків гіперваріабельної області (HVR). FR варіабельного домена зазвичай складається з чотирьох FR-доменив: FR1, FR2, FR3 і FR4. Відповідно, послідовності HVR і FR у складі VH (або

VL), як правило, визначаються в наступній послідовності: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

У даному контексті терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" та "ціле антитіло" є взаємозамінними і відносяться до антитіла, структура якого по суті аналогічна структурі нативного антитіла, або яке включає важкі ланцюги, що містять Fc-область, описану у даному документі.

Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїнів" і "культура клітин-хазяїнів" застосовуються як взаємозамінні та відносяться до клітин, у які введена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяїни включають "трансформанти" і "трансформовані клітини", які включають первинно трансформовані клітини й отримане від них потомство, незалежно від кількості пересіювань. Потомство може не бути повністю ідентичним вихідній клітці за вмістом нуклеїнових кислот, і може містити мутації. Даний опис включає мутантне потомство, що має ту саму функцію або біологічну активність, яку спостерігали під час скринінгу або відбору з первинно трансформованих клітин.

"Антитіло людини" являє собою антитіло, що має амінокислотну послідовність, яка відповідає послідовності антитіла, що продукується в організмі людини або клітині людини або має походження з нелюдського джерела, яке використовує репертуар антитіл людини або інші послідовності, що кодують антитіло людини. З цього визначення антитіла людини, зокрема, виключене гуманізоване антитіло, що містить антигензв'язуючі залишки нелюдського походження.

Термін "варіабельна область" або "варіабельний домен" відноситься до домена важкого або легкого ланцюга антитіла, що бере участь у зв'язуванні антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга та легкого ланцюга (VH і VL, відповідно) нативного антитіла зазвичай мають аналогічну структуру, причому кожний домен містить чотири консервативні каркасні області (FR) і три гіперваріабельні області (HVR). (Див., наприклад, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., стор. 91 (2007).) Одного VH- або VL-домена може бути досить для надання антигензв'язуючої специфічності. Крім того, антитіла, які зв'язуються з конкретним антигеном, можна виділити, використовуючи VH- або VL-домени антитіла, що зв'язується з антигеном, для скринінгу бібліотеки послідовностей, комплементарних VL- або VH-доменам, відповідно. Див., наприклад, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

"Консенсусний каркас людини" є каркасом, що являє найпоширеніші амінокислотні залишки при відборі VL- або VH-каркасних послідовностей імуноглобуліну людини. Як правило, відбір VL- або VH-послідовностей імуноглобуліну людини здійснюють з підгрупи послідовностей варіабельного домена. Як правило, підгрупа послідовностей являє собою підгрупу за Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. В одному варіанті реалізації винаходу VL підгрупа являє собою підгрупу каппа I за Kabat et al., вище. В одному з варіантів реалізації винаходу VH підгрупа являє собою підгрупу III за Kabat et al., вище.

"Гуманізоване" антитіло відноситься до химерного антитіла, що містить амінокислотні залишки з HVR нелюдського походження й амінокислотні залишки з FR людини. У деяких варіантах реалізації гуманізоване антитіло містить практично все з щонайменше одного, а зазвичай - двох варіабельних доменів, у яких усі або практично всі HVR (наприклад, CDR) відповідають аналогічним ділянкам з антитіла нелюдського походження, і всі або практично всі FR-області відповідають послідовності антитіла людини. У деяких випадках гуманізоване антитіло може містити щонайменше фрагмент константної області антитіла, що має походження з антитіла людини. "Гуманізована форма" антитіла, наприклад, антитіла нелюдського походження, відноситься до антитіла, яке піддане гуманізації.

У даному контексті термін "гіперваріабельна область" або "HVR" відноситься до кожної з областей варіабельного домена антитіла, що мають гіперваріабельні послідовності ("області, що визначають комплементарність" або "CDR") й/або утворюють структурно певні петлі ("гіперваріабельні петлі") та/або містять залишки, що контактують з антигеном ("антигенні контакти"). Як правило, антитіла містять шість HVR: три у VH (H1, H2, H3) і три у VL (L1, L2, L3). Типові HVR, описані у даному документі, включають:

(а) гіперваріабельні петлі, що знаходяться в області амінокислотних залишків 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987));

(b) CDR, що знаходяться в області амінокислотних залишків 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) і 95-102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(с) антигенні контакти, що знаходяться в області амінокислотних залишків 27с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) і 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)); а також

(d) комбінації (a), (b) і/або (с), включаючи амінокислотні залишки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) і 94-102 (H3).

Якщо не зазначено інше, залишки HVR й інші залишки у варіабельному домені (наприклад, FR-залишки) у даному документі нумерують за Kabat et al., вище.

"Імунокон'югат" являє собою антитіло, кон'юговане з однією або більше гетерологічними молекулами, включаючи цитотоксичний агент, але не обмежуючись ним.

"Індивід" або "суб'єкт" являє собою ссавця. Ссавці включають одомашнених тварин (наприклад, корів, овець, кішок, собак і коней), приматів (наприклад, людей та приматів, що не є людьми, наприклад, мавп), кроликів і гризунів (наприклад, мишей та пацюків), але не обмежуються ними. У деяких варіантах реалізації індивід або суб'єкт є людиною.

"Виділене антитіло" являє собою антитіло, відділене від компонента свого природного оточення. У деяких варіантах реалізації антитіло є очищеним до більше ніж 95 % або 99 % чистоти, обумовленої, наприклад, за допомогою електрофорезу (наприклад, електрофорезу в ДСН-ПААГ, ізоелектричного фокусування (ІЕФ), капілярного електрофорезу) або хроматографії (наприклад, іонообмінної або звернено-фазної ВЕРХ). Огляд способів оцінки чистоти антитіл див., наприклад, у роботі Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

"Виділена" нуклеїнова кислота являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, відділену від компонентів свого природного оточення. Виділена нуклеїнова кислота включає молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які зазвичай містять зазначену молекулу нуклеїнової кислоти, однак зазначена молекула нуклеїнової кислоти присутня поза хромосомою або в області хромосоми, яка відрізняється від її природного місця розташування в хромосомі.

"Виділена нуклеїнова кислота, що кодує антитіло проти тау-білка" відноситься до однієї або більше молекул нуклеїнової кислоти, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла (або їх фрагменти), включаючи таку(і) молекулу(и) нуклеїнової кислоти в складі одного вектора або окремих векторів і таку(і) молекулу(и) нуклеїнової кислоти, що присутня(і) в одному або більше місцях розташування в клітині-хазяїні.

У даному документі термін "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, отриманого з популяції практично однорідних антитіл, тобто, окремих антитіл, що становлять популяцію, які є ідентичними і/або зв'язують той самий епітоп, за винятком можливих варіантних антитіл, наприклад природні мутації, що містять або виникають під час продукування моноклонального антитіла, причому такі варіанти присутні в незначних кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які зазвичай містять різні антитіла проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло з препарату моноклонального антитіла спрямоване проти однієї детермінанти антигена. Таким чином, модифікатор "моноклональне" вказує на те, що антитіло одержують з практично однорідної популяції антитіл; його не слід інтерпретувати як вимогу щодо продукції антитіла за допомогою якого-небудь конкретного способу. Наприклад, моноклональні антитіла для застосування згідно з даним винаходом можна одержати за допомогою різних способів, включаючи гібридомний спосіб, методики рекомбінантних ДНК, методики фагового дисплея та способи з використанням трансгенних тварин, повністю або частково утримуючих локуси імуноглобуліну людини, але не обмежуючись ними, причому такі способи та інші типові способи одержання моноклональних антитіл описані у даному документі.

Термін "вільне антитіло" відноситься до антитіла, яке не кон'юговане з гетерологічною групою (наприклад, цитотоксичною групою) або радіоактивною міткою. Вільне антитіло може бути присутнім у фармацевтичному складі.

"Нативні антитіла" відносяться до природних молекул імуноглобуліну з різною структурою. Наприклад, нативні IgG-антитіла зазвичай являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни з молекулярною масою близько 150000 дальтон, що складаються з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів, які зв'язані дисульфідними зв'язками. Кожний важкий ланцюг від N-кінця до C-кінця містить варіабельну область (VH), яку також називають варіабельним важким доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, а потім три константні домени (CH1, CH2 і CH3). Аналогічно, кожний легкий ланцюг від N-кінця до C-кінця містить варіабельну область (VL), яку також називають варіабельним легким доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, а потім константний легкий домен (CL). Залежно від амінокислотної послідовності константного домена легкий ланцюг антитіла можна віднести до одного з двох типів, які називають каппа (κ) і лямбда (λ).

Термін "вкладиш в упакування" відноситься до інструкцій, які у звичайному порядку вкладаються в упакування терапевтичних продуктів для продажу, що містять інформацію про

показання, застосування, дози, введення, комбіновану терапію, протипоказання та/або застереження, що стосуються застосування таких терапевтичних продуктів.

"Відсоток (%) ідентичності амінокислотної послідовності" стосовно послідовностей еталонних поліпептидів визначають як процентний вміст амінокислотних залишків у послідовності-кандидаті, ідентичних амінокислотним залишкам у послідовності еталонного поліпептиду після вирівнювання послідовностей та, при необхідності, введення розривів для досягнення максимальної процентної ідентичності послідовностей без урахування яких-небудь консервативних заміни як частини ідентичності послідовностей. Вирівнювання для цілей визначення процентної ідентичності амінокислотних послідовностей можна здійснити різними способами, відомими фахівцям в даній області техніки, наприклад, використовуючи загальнодоступне комп'ютерне програмне забезпечення, наприклад, програмне забезпечення BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівці в даній області техніки можуть визначити відповідні параметри вирівнювання послідовностей, включаючи алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання за всією довжиною порівнюваних послідовностей. У той самий час усі використовувані для цілей даного документа процентні значення ідентичності амінокислотних послідовностей отримані із застосуванням комп'ютерної програми для порівняння послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма для порівняння послідовностей ALIGN-2 розроблена компанією Genentech, Inc., а вихідний код представлений у документації користувача у Бюро з охорони авторських прав США, Вашингтон, округ Колумбія, 20559, де зареєстрований під номером реєстрації авторського права США TXU510087. Програма ALIGN-2 знаходиться у вільному доступі в Genentech, Inc., Саут-Сан-Франциско, Каліфорнія, або може бути скопійована з вихідного коду. Програму ALIGN-2 слід копіювати для застосування в операційній системі UNIX, включаючи цифрову версію UNIX V4.0D. Всі параметри порівняння послідовностей встановлюються програмою ALIGN-2 і залишаються незмінними.

У випадках, коли ALIGN-2 використовують для порівняння амінокислотних послідовностей, % ідентичності амінокислотної послідовності даної амінокислотної послідовності А з, у порівнянні з або щодо даної амінокислотної послідовності В (що можна переформулювати так, що дана амінокислотна послідовність А характеризується або включає певний % ідентичності амінокислотної послідовності з, у порівнянні з або щодо даної амінокислотної послідовності В) розраховують у такий спосіб:

100-кратне відношення X/Y

де Х означає кількість амінокислотних залишків, що вважаються ідентичними збігами при вирівнюванні А і В за допомогою програми вирівнювання послідовностей ALIGN-2, і де Y означає загальну кількість амінокислотних залишків у В. Слід приймати до уваги, що якщо довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності В, % ідентичності амінокислотної послідовності А стосовно В не дорівнює % ідентичності амінокислотної послідовності В стосовно А. Якщо не зазначено інше, всі використовувані у даному документі процентні значення ідентичності амінокислотних послідовностей отримані, як описано безпосередньо у попередньому абзаці із застосуванням комп'ютерної програми ALIGN-2.

Термін "фармацевтичний склад" відноситься до препарату, який знаходиться у формі, що забезпечує ефективну біологічну активність активного інгредієнта, що міститься в ньому, і не містить додаткових компонентів, що є неприйнятно токсичними для суб'єкта, якому повинен бути введений склад.

"Фармацевтично прийнятний носій" відноситься до інгредієнта у фармацевтичному складі, який відрізняється від активного інгредієнта й є нетоксичним для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає буфер, допоміжну речовину, стабілізатор або консервант, але не обмежується ними.

У даному контексті термін "тау-білок" відноситься до будь-якого нативного тау-білка з будь-якого джерела, що відноситься до хребетних, включаючи ссавців, наприклад, приматів (наприклад, людей) і гризунів (наприклад, мишей та пацюків), якщо не зазначено інше. Цей термін включає "повнорозмірний" непроцесований тау-білок, а також будь-яку форму тау-білка, отриману в результаті процесингу в клітині. Даний термін також охоплює природні варіанти тау-білка, наприклад, сплайс-варіанти або алельні варіанти.

Термін "pTau", що використовується у даному документі, відноситься до тау-білка, в якому залишки серину, треоніну або тирозину фосфориловані протеїнкіназою шляхом додавання ковалентно зв'язаної фосфатної групи. У деяких варіантах реалізації pTau фосфорилований за залишком серину або треоніну. У деяких варіантах реалізації pTau фосфорилований за залишком серину у положенні 409 та/або за залишком серину у положенні 404. У деяких варіантах реалізації pTau фосфорилований за залишком серину у положенні 409.

Термін "розчинний тау-білок" у даному документі відноситься до білків, що складаються з обох повністю розчинених мономерів тау-білка/пептиду або тауподібних пептидів/білків, або модифікованих або вкорочених тау-пептидів/білків або інших похідних мономерів тау-білка/пептиду й олігомерів тау-білка. "Розчинний тау-білок" виключає, зокрема, нейрофібрилярні клубки (NFT).

Термін "нерозчинний тау-білок" у даному документі відноситься до множинних агрегованих мономерів тау-пептиду або білка, або тауподібних пептидів/білків, або модифікованих або вкорочених тау-пептидів/білків, або інших похідних тау-пептидів/білків, що утворюють олігомерні або полімерні структури, які є нерозчинними як *in vitro* у водному середовищі, так й *in vivo* в організмі ссавця або людини, особливо - у головному мозку, але, зокрема, відноситься до множинних агрегованих мономерів тау-білка або модифікованих або вкорочених тау-пептидів/білків або їх похідних, нерозчинних в організмі ссавця або людини, особливо - у головному мозку, відповідно. "Нерозчинний тау-білок" включає, зокрема, нейрофібрилярні клубки (NFT).

Термін "мономерний тау-білок" або "мономер тау-білка" у даному документі відноситься до повністю солюбілізованих тау-білків, що не містять агрегованих комплексів у водному середовищі.

Терміни "агрегований тау-білок", "олігомерний тау-білок" й "олігомер тау-білка" у даному документі відносяться до множинних агрегованих мономерів тау-пептидів або білків, або тауподібних пептидів/білків, або модифікованих або вкорочених тау-пептидів/білків, або інших похідних тау-пептидів/білків, що утворюють олігомерні або полімерні структури, нерозчинні або розчинні як *in vitro* у водному середовищі, так й *in vivo* в організмі ссавця або людини, особливо - у головному мозку, але, зокрема, відносяться до множинних агрегованих мономерів тау-білка або модифікованих або вкорочених тау-пептидів/білків або їх похідних, нерозчинних або розчинних в організмі ссавця або людини, особливо - у головному мозку, відповідно.

Терміни "PTau PHF", "PHF" і "парні спіральні філаменти" у даному описі використовують як синоніми, і вони відносяться до пар філаментів, звитих у спіралі з видимою при електронній мікроскопії періодичністю, рівною 160 нм. Ширина варіюється в діапазоні 10-22 нм. PHF являють собою переважні структури в нейрофібрилярних клубках при хворобі Альцгеймера (ХА) та нейропільних нитках. PHF також можна спостерігати у деяких, але не всіх дистрофічних нейритах, пов'язаних з нейритичними бляшками. Основним компонентом PHF є гіперфосфорилована форма асоційованого з мікротрубочками тау-білка. PHF може частково складатися з антипаралельних гіперфосфорилованих тау-білків, зв'язаних дисульфідними зв'язками. Тау-білок PHF може бути вкорочений за С-кінцем на 20 амінокислотних залишків. Механізми, що лежать в основі утворення PHF, неясні, однак гіперфосфорилювання тау-білка може відокремлювати його від мікротрубочок, збільшуючи розчинний пул тау-білка, з якого всередині нейронів можуть утворюватися PHF.

У даному документі термін "лікування" (та його граматичні варіанти, такі як "лікувати" або "впливати") відноситься до клінічного втручання в спробі змінити природню динаміку стану індивідуума, що підданий лікуванню, і може застосовуватися як для профілактики, так і для впливу на хід клінічної патології. Бажані ефекти лікування включають запобігання виникнення або поновлення захворювання, полегшення симптомів, зменшення прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, запобігання метастазування, зниження швидкості прогресування захворювання, поліпшення або тимчасове полегшення патологічного стану, а також ремісію або поліпшення прогнозу, але не обмежуються ними. У деяких варіантах реалізації антитіла згідно з даним винаходом застосовують для затримки розвитку захворювання або вповільнення прогресування захворювання.

Термін "рання хвороба Альцгеймера" або "рання ХА" у контексті даного документа (наприклад, "пацієнт з діагнозом ранньої ХА" або "пацієнт, що страждає ранньою ХА") включає пацієнтів з легким когнітивним порушенням, наприклад, дефіцитом пам'яті через ХА, і пацієнтів з наявністю біомаркерів ХА, наприклад, амілоїд-позитивних пацієнтів.

Термін "хвороба Альцгеймера легкого ступеня тяжкості" або "ХА легкого ступеня тяжкості" у даному документі (наприклад, "пацієнт з діагнозом ХА легкого ступеня тяжкості") відноситься до стадії ХА, що характеризується оцінкою від 20 до 26 балів за шкалою MMSE.

Термін "хвороба Альцгеймера легкого або помірного ступеня тяжкості" або "ХА легкого або помірного ступеня тяжкості" у даному документі відноситься як до легкої, так і до помірної ХА, і характеризується оцінкою від 18 до 26 балів за шкалою MMSE.

Термін "хвороба Альцгеймера помірного ступеня тяжкості" або "ХА помірного ступеня тяжкості" у контексті даного документа (наприклад, "пацієнт з діагнозом ХА помірного ступеня

тяжкості") відноситься до стадії ХА, яка характеризується оцінкою від 18 до 19 балів за шкалою MMSE.

Термін "MMSE" відноситься до короткої шкали оцінки психічного статусу, яка забезпечує оцінку в діапазоні від 1 до 30 балів. Див. Folstein, et al., 1975, J. Psychiatr. Res. 12:189-98. Оцінки 26 балів і нижче, як правило, вважаються ознакою дефіциту. Чим нижче бальна оцінка за шкалою MMSE, тим більше в обстеженого пацієнта виражений дефіцит або погіршення у порівнянні з іншим індивідом з більшою низькою оцінкою. Збільшення оцінки за шкалою MMSE свідчить про поліпшення стану пацієнта, у той час як зниження оцінки за шкалою MMSE може означати погіршення стану пацієнта.

У даному документі термін "вектор" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, здатної забезпечувати репродукцію іншої, пов'язаної з нею нуклеїнової кислоти. Зазначений термін включає вектор, що знаходиться у вигляді самореplikуючої нуклеїнової кислоти, а також вектор, здатний впроваджуватися в геном клітини-хазяїна, в яку його вводять. Деякі вектори здатні керувати експресією нуклеїнових кислот, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори у даному документі називають "експресійними векторами".

II. Композиції та способи

У даному винаході запропоновані антитіла, що зв'язують тау-білок. У деяких варіантах реалізації антитіло, яке запропоноване у даному документі, зв'язує мономерний тау-білок людини з K_D менше 1 нМ або менше 0,5 нМ. У деяких варіантах реалізації антитіло, яке запропоноване у даному документі, зв'язує тау-білок яванського макака з K_D менше 1 нМ або менше 0,5 нМ. У деяких варіантах реалізації K_D визначають за допомогою поверхневого плазмонного резонансу при 37 °C. У деяких варіантах реалізації антитіло згідно з даним винаходом, що зв'язує тау-білок, зв'язує мономерний тау-білок, олігомерний тау-білок, нефосфорилований тау-білок і фосфорилований тау-білок. У деяких варіантах реалізації антитіло згідно з даним винаходом зв'язується з епітопом у межах амінокислот 2-24 зрілого тау-білка людини. У деяких варіантах реалізації антитіло згідно з даним винаходом зв'язується з епітопом у межах амінокислот 2-24 тау-білка та зв'язує мономерний тау-білок, олігомерний тау-білок, нефосфорилований тау-білок і фосфорилований тау-білок. У деяких варіантах реалізації антитіло зв'язує епітоп тау-білка людини, що містить або складається з послідовності AEPRQEFVMDHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO:2). У деяких варіантах реалізації антитіло зв'язує епітоп тау-білка яванського макака, що містить або складається з послідовності AEPRQEFVMDHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO:4). У деяких варіантах реалізації антитіло зв'язує епітоп тау-білка людини, що містить або складається з послідовності AEPRQEFVMDHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO:2) й епітоп тау-білка яванського макака, що містить або складається з послідовності AEPRQEFVMDHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO:4).

У деяких варіантах реалізації антитіло, яке запропоноване у даному документі, зв'язується з епітопом у межах 19-33, 19-42, 37-51, 100-114, 118-132 або 172-177 амінокислот зрілого тау-білка людини. У деяких варіантах реалізації антитіло згідно з даним винаходом зв'язується з епітопом у межах 19-33, 19-42, 37-51, 100-114, 118-132 або 172-177 амінокислот тау-білка та зв'язує мономерний тау-білок, олігомерний тау-білок, нефосфорилований тау-білок і фосфорилований тау-білок.

Антитіла згідно з даним винаходом можна використовувати, наприклад, для діагностики або лікування нейродегенеративних захворювань.

A. Приклади антитіл проти тау-білка

У деяких варіантах реалізації антитіло містить HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:605; HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:606; і HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:607.

У деяких варіантах реалізації зазначене антитіло містить HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:608; HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:609; і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:610.

У деяких варіантах реалізації зазначене антитіло містить HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:605; HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:606; HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:607; HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:608; HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:609; і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:610.

У будь-якому з вищевказаних варіантів реалізації антитіло проти тау-білка є гуманізованим. У деяких варіантах реалізації антитіло проти тау-білка містить HVR згідно з будь-яким із вищевказаних варіантів реалізації та додатково містить акцепторний каркас людини, наприклад, каркас імуноглобуліну людини або консенсусний каркас людини.

В ще одному аспекті антитіло проти тау-білка містить послідовність варіабельного домена важкого ланцюга (VH), що має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності стосовно амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 340, 603, 614 або 619. У деяких варіантах реалізації VH-послідовність, що має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або делеції у порівнянні з еталонною послідовністю, однак антитіло проти тау-білка, що містить зазначену послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з тау-білком. У деяких варіантах реалізації замінені, вставлені та/або вилучені в цілому від 1 до 10 амінокислот з SEQ ID NO:340, 603, 614 або 619. У деяких варіантах реалізації винаходу заміни, інсерції або делеції присутні в областях, розташованих поза HVR (тобто у FR). Антитіло проти тау-білка необов'язково містить послідовність VH з SEQ ID NO: 340, 603, 614 або 619, у тому числі посттрансляційні модифікації зазначеної послідовності. У конкретному варіанті реалізації винаходу VH містить одну, дві або три HVR, вибрані з: (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:605, (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:606, і (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:607.

В ще одному аспекті антитіло проти тау-білка містить послідовність варіабельного домена легкого ланцюга (VL), що має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності стосовно амінокислотної послідовності SEQ ID NO:341, 604, 615 або 620. У деяких варіантах реалізації VL-послідовність, що має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або делеції у порівнянні з еталонною послідовністю, однак антитіло проти тау-білка, що містить зазначену послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з тау-білком. У деяких варіантах реалізації замінені, вставлені та/або вилучені в цілому від 1 до 10 амінокислот з SEQ ID NO:341, 604, 615 або 620. У деяких варіантах реалізації винаходу заміни, інсерції або делеції присутні в областях, розташованих поза HVR (тобто у FR). Антитіло проти тау-білка необов'язково містить послідовність VL з SEQ ID NO: 341, 604, 615 або 620, у тому числі посттрансляційні модифікації зазначеної послідовності. У конкретному варіанті реалізації винаходу VL містить одну, дві або три HVR, вибрані з: (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:608, (b) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:609, і (c) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:610.

У деяких варіантах реалізації антитіло проти тау-білка містить:

- a) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:603;
- b) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:604;
- c) VH згідно з варіантом (a) і VL згідно з варіантом (b);
- d) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:614;
- e) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:615;
- f) VH згідно з варіантом (d) і VL згідно з варіантом (e);
- g) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:619;
- h) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO:620;
- i) VH згідно з варіантом (g) і VL згідно з варіантом (h).

У деяких варіантах реалізації антитіло проти тау-білка містить:

- a) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить SEQ ID NO:603;
- b) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить SEQ ID NO:604;
- c) VH згідно з варіантом (a) і VL згідно з варіантом (b);
- d) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить SEQ ID NO:614;
- e) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить SEQ ID NO:615;
- f) VH згідно з варіантом (d) і VL згідно з варіантом (e);
- g) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить SEQ ID NO:619;
- h) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить SEQ ID NO:620;
- i) VH згідно з варіантом (g) і VL згідно з варіантом (h).

У деяких варіантах реалізації антитіло проти тау-білка містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність, яка вибрана з SEQ ID NO:603, 614 і 619; і варіабельну

людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:617, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:618.

У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:621 або SEQ ID NO:622, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:623. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:621, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:623. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:621 або SEQ ID NO:622, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:623. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:621, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:623. У деяких варіантах реалізації запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, причому зазначене антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:622, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:623.

У додатковому аспекті даного винаходу запропоноване антитіло, що зв'язується з тим самим епітопом, що й антитіло проти тау-білка, запропоноване у даному документі. Наприклад, у деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло, що зв'язується з тим самим епітопом, що й антитіло, вибране з 37D3-H9, hu37D3-H9.v28.A4, hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 і hu37D3-H9.v93. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло, що зв'язується з епітопом у межах фрагмента тау-білка, що складається з амінокислот 2-24 SEQ ID NO:2. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло, що зв'язується з епітопом у межах фрагмента тау-білка, що складається з амінокислот 7-24 SEQ ID NO:2. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло, що зв'язується з епітопом у межах фрагмента тау-білка, що складається з амінокислот 7-20 SEQ ID NO:2. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло, що зв'язується з епітопом у межах фрагмента тау-білка, що складається з амінокислот 10-24 SEQ ID NO:2. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло, що зв'язується з епітопом у межах фрагмента тау-білка, що складається з амінокислот 7-21 SEQ ID NO:2. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло, що зв'язується з епітопом у межах фрагмента тау-білка, що складається з амінокислот 8-22 SEQ ID NO:2. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло, що зв'язується з епітопом у межах фрагмента тау-білка, що складається з амінокислот 11-25 SEQ ID NO:2. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло, що зв'язується з одним або більше або всіма з наступних фрагментів тау-білка: 2-24, 7-24, 7-20, 10-24, 7-21, 8-22 і 11-25. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло, що зв'язується з пептидом, що містить послідовність SEQ ID NO:593, однак не зв'язується з пептидом, що містить послідовність SEQ ID NO:596 або SEQ ID NO:597.

У додатковому аспекті даного винаходу антитіло проти тау-білка згідно з будь-яким із вищезгаданих варіантів реалізації є моноклональним антитілом, включаючи химерне, гуманізоване антитіло або антитіло людини. В одному варіанті реалізації антитіло проти тау-білка являє собою фрагмент антитіла, наприклад, Fv, Fab, Fab', scFv, діатіло або P(ab')₂-фрагмент. В ще одному варіанті реалізації антитіло являє собою повнорозмірне антитіло, наприклад, інтактне антитіло IgG1 або IgG4, або антитіло, що відноситься до іншого класу або ізотипу, як визначено у даному документі.

У додатковому аспекті антитіло проти тау-білка згідно з будь-яким із вищезгаданих варіантів реалізації може мати будь-яку з характеристик окремо або в комбінації, як описано в розділах 1-7 нижче.

1. Спорідненість антитіла

У деяких варіантах реалізації антитіло, запропоноване у даному документі, має константу дисоціації (K_D), що становить $\leq 1 \text{ мкМ}$, $\leq 100 \text{ нМ}$, $\leq 10 \text{ нМ}$, $\leq 1 \text{ нМ}$, $\leq 0,1 \text{ нМ}$, $\leq 0,01 \text{ нМ}$ або $\leq 0,001 \text{ нМ}$ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М , наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М).

У деяких варіантах реалізації K_D вимірюють за допомогою аналізу зв'язування антигена, міченого радіоактивною міткою (PIA). У деяких варіантах реалізації PIA виконують з використанням Fab-версії досліджуваного антитіла та його антигена. Спорідненість зв'язування Fab з антигеном у розчині вимірюють шляхом врівноважування Fab з мінімальною концентрацією (^{125}I)-міченого антигена у присутності серії розведень неміченого антигена, з наступним захопленням зв'язаного антигена за допомогою планшета з іммобілізованим антитілом проти Fab (див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Для визначення умов аналізу багатолункові планшети MICROTITER® (Thermo Scientific) покривали протягом ночі 5 мкг/мл антитіла для захоплення Fab (Cappel Labs) в 50 мМ розчині карбонату натрію (pH 9,6), а потім блокували 2 % (мас./об.) розчином бичачого сироваткового альбуміну в PBS протягом двох - п'яти годин при кімнатній температурі (приблизно 23 °C). У неадсорбуючому планшеті (Nunc #269620) змішували 100 пМ або 26 пМ [^{125}I]-антигена з послідовно розведеними розчинами досліджуваних Fab (наприклад, відповідно до оцінки антитіл Fab-12 проти ФРЕС у роботі Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Потім досліджуваний Fab інкубували протягом ночі; у той самий час, інкубування могло тривати протягом більше тривалого періоду (наприклад, приблизно 65 годин) для гарантії досягнення рівноваги. Потім суміш переносили на планшет для захоплення й інкубували при кімнатній температурі (наприклад, протягом години). Потім видаляли розчин і вісім разів промивали планшети 0,1 % полісорбатом-20 (TWEEN-20®) у PBS. Після висушування планшетів додавали 150 мкл сцинтилятора (MICROSCINT-20; Packard) на лунку та робили підрахунок планшетів на гамма-лічильнику TOPCOUNT™ (Packard) протягом десяти хвилин. Концентрації кожного Fab, що забезпечували зв'язування, менше або рівне 20 % від максимального, відбирають для застосування в конкурентному аналізі зв'язування.

Згідно з ще одним варіантом реалізації, K_D вимірюють з використанням аналізу BIACORE® на основі поверхневого плазмонного резонансу. Наприклад, аналіз із використанням BIACORE®-2000 або BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Піскатауей, штат Нью-Джерсі, США) виконують при 25 °C або 37 °C з чипами CM5 з іммобілізованим антигеном при ~ 10 резонансних одиницях (РУ). У деяких варіантах реалізації біосенсорні чипи на основі карбоксиметилованого декстрану (CM5, BIAcore, Inc.) активують гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) згідно з інструкціями постачальника. Антиген розбавляють 10 мМ розчином ацетату натрію, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) і вводять при швидкості потоку 5 мкл/хвилину, до досягнення приблизно 10 резонансних одиниць (РУ) зв'язаного білка. Після введення антигена вводять 1 М розчин етаноламіну для блокування непрореагувавших груп. Для вимірювань кінетики дворазові серійні розведення Fab (від 0,78 нМ до 500 нМ) вводять у PBS з 0,05 % поверхнево-активною речовиною полісорбатом-20 (TWEEN-20™) (PBST) при 25 °C при швидкості потоку приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (K_{on}) і дисоціації (K_{off}) розраховували за допомогою найпростішої моделі зв'язування Ленгмюра при співвідношенні один до одного (програме забезпечення BIACORE® Evaluation Software версії 3.2) шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації та дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (K_D) обчислюють як відношення K_{off}/K_{on} . Див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Якщо швидкість асоціації згідно з вищеописаним аналізом поверхневого плазмонного резонансу перевищує $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, то її можна визначити за допомогою методики гасіння флуоресценції, що вимірює збільшення або зниження інтенсивності випущення флуоресценції (порушення = 295 нм; випущення = 340 нм, смуга пропущення 16 нм) при <25 °C для 20 нМ розчину антитіл проти антигена (у формі Fab) у PBS, pH 7,2, у присутності зростаючих концентрацій антигена, вимірюваних на спектрометрі, наприклад, на спектрофотометрі з пристроєм зупинки потоку (Aviv Instruments) або спектрофотометрі SLM-AMINCO™ 8000 серії (Thermospectronic) з кюветою, що перемішується.

2. Фрагменти антитіл

У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, запропоноване у даному документі, являє собою фрагмент антитіла. Фрагменти антитіла включають Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv і scFv-фрагменти та інші фрагменти, описані нижче, але не обмежуються ними. Огляд деяких фрагментів антитіл див. у статті Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003). Огляд фрагментів scFv див., наприклад, у роботі Pluckthün, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); див. також WO 93/16185; і патенти США № 5571894 і 5587458. Обговорення Fab і P(ab')₂-фрагментів, що містять залишки епітопу зв'язування рецептора реутилізації та мають збільшений період напівжиття in vivo, див. у патенті США № 5869046.

Діатіла являють собою фрагменти антитіл з двома антигензв'язуючими сайтами, які можуть бути двовалентними або біспецифічними. Див., наприклад, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson

et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); i Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). Триатіла та тетратіла також описані у публікації Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Однодоменні антитіла являють собою фрагменти антитіл, що повністю або частково містять варіабельний домен важкого ланцюга або повністю або частково містять варіабельний домен легкого ланцюга антитіла. У деяких варіантах реалізації однодоменне антитіло являє собою однодоменне антитіло людини (Domantis, Inc., Уолтем, штат Массачусетс, США; див., наприклад, патент США № 6248516 В1).

Фрагменти антитіл можна одержати різними способами, включаючи протеолітичний гідроліз інтактного антитіла, а також продукцію рекомбінантними клітинами-хазіянами (наприклад, *E. coli* або фагом), як описано у даному документі, але не обмежуючись ними.

3. Химерні та гуманізовані антитіла

У деяких варіантах реалізації антитіло, запропоноване у даному документі, являє собою химерне антитіло. Деякі химерні антитіла описані, наприклад, у патенті США № 4816567; i Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). В одному прикладі химерне антитіло містить варіабельну область нелюдського походження (наприклад, варіабельну область, що має походження від антитіла миші, пацюка, хом'яка, кролика або примата, що не є людиною, наприклад, мавпи) і константну область людини. В ще одному прикладі химерне антитіло являє собою антитіло з "переключеним класом", в якому змінений клас або підклас у порівнянні з батьківським антитілом. Термін "химерні антитіла" включає антигензв'язуючі фрагменти таких антитіл.

У деяких варіантах реалізації химерне антитіло є гуманізованим антитілом. Як правило, антитіло нелюдського походження гуманізують з метою зниження імуногенності для людини, зберігаючи при цьому специфічність та спорідненість вихідного антитіла нелюдського походження. Як правило, гуманізоване антитіло містить один або більше варіабельних доменів, у яких HVR, наприклад, CDR (або їх фрагменти) походять від антитіла нелюдського походження, а FR (або їх фрагменти) походять від послідовностей антитіла людини. У деяких випадках гуманізоване антитіло також може містити щонайменше фрагмент константної області антитіла людини. У деяких варіантах реалізації деякі FR-залишки в гуманізованому антитілі замінюють відповідними залишками антитіла нелюдського походження (наприклад, антитіла, з якого отримані залишки HVR), наприклад, з метою відновлення або поліпшення специфічності або спорідненості антитіла.

Гуманізовані антитіла та способи їх виготовлення розглянуті, наприклад, у публікації Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), і додатково описані, наприклад, у статтях Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); патентах США № 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321 і 7,087,409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (де описане пересадження областей, що визначають специфічність (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (де описана "зміна поверхні"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (де описане "перетасування FR"); й Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) і Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (де описаний підхід "спрямованого відбору" до перетасування FR).

Каркасні області людини, які можна використовувати для гуманізації, включають: каркасні області, вибрані за допомогою методики "найкращої відповідності" (див., наприклад, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасні області, що мають походження від консенсусної послідовності антитіл людини конкретної підгрупи варіабельних областей легкого або важкого ланцюга (див., наприклад, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); i Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); зрілі (що містять соматичні мутації) каркасні області людини або ембріональні каркасні області людини (див., наприклад, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); і каркасні області, отримані при скринінгу бібліотек FR (див., наприклад, Vasa et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) і Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)), але не обмежуються ними.

4. Антитіла людини

У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, запропоноване у даному документі, являє собою антитіло людини. Антитіла людини можна одержати, використовуючи різні методики, відомі в даній області техніки. Антитіла людини загалом описані в статтях van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) і Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Антитіла людини можна одержати шляхом введення імуногена трансгенній тварині, модифікованій з метою продукції інтактних людських антитіл або інтактних антитіл з людськими варіабельними областями у відповідь на антигенну стимуляцію. Такі тварини, як правило, цілком або частково містять локуси імуноглобулінів людини, що заміщають ендogenous локуси імуноглобулінів або локалізовані поза хромосомами або випадковим чином інтегровані в

хромосоми тварини. Як правило, у таких трансгенних мишей інактивовані ендегенні локуси імуноглобулінів. Огляд способів одержання антитіл людини з трансгенних тварин див. в Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Крім того, див., наприклад, патенти США № 6075181 і 6150584, у яких описана технологія XENOMOUSE™; патент США № 5770429, у якому описана технологія Humab®; патент США № 7041870, у якому описана технологія K-M MOUSE®, і публікації заявки на патент США № US 2007/0061900, у якій описана технологія VELOCIMOUSE®). Варіабельні області людини з інтактних антитіл, які генеруються такими тваринами, можна додатково модифікувати, наприклад, шляхом об'єднання з іншою константною областю людини.

Антитіла людини можна одержати за допомогою способів на основі гібридом. Описані лінії клітин мієломи людини і гетеромієломи миші-людини для продукції моноклональних антитіл людини, (див., наприклад, Kozbor *J. Immunol.* 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); i Boerner et al., *J. Immunol.* 147:86 (1991).) Антитіла людини, отримані за допомогою технології на основі В-клітинної гібридомі людини, також описані в Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Додаткові способи включають, наприклад, способи, описані у патенті США № 7189826 (де описана продукція моноклональних IgM-антитіл людини гібридомною клітинною лінією) і статті Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (де описані гібридомі людини-людини). Технологія на основі гібридомі людини (Trioma technology) також описана в статтях Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) i Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005).

Антитіла людини також можна одержати шляхом виділення Fv-клону послідовностей варіабельного домена, вибраних із бібліотек фагового дисплея людського походження. Такі послідовності варіабельного домена потім можна поєднувати з бажаними константними доменами людини. Методики відбору антитіл людини з бібліотек антитіл описані нижче.

5. Антитіла, отримані з бібліотек

Антитіла згідно з даним винаходом можна виділити шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек на предмет антитіл з бажаною активністю або активностями. Наприклад, в даній області техніки відомі різні способи одержання бібліотек фагового дисплея та скринінг таких бібліотек на предмет антитіл, що мають бажані характеристики зв'язування. Такі способи розглянуті, наприклад, у публікації Hoogenboom et al. In *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) і додатково описані, наприклад, у статтях McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004); i Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004).

У деяких способах на основі фагового дисплея репертуари VH- і VL-генів окремо клонують за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і випадковим чином рекомбінують у фагових бібліотеках, які потім можна піддавати скринінгу на предмет антиген-сполучного фага, як описано в статті Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994). Фаг зазвичай відображає фрагменти антитіла у вигляді одноланцюгових Fv-фрагментів (scFv) або Fab-фрагментів. Бібліотеки з імунізованих джерел дозволяють одержати антитіла з високою спорідненістю до імуногена без необхідності конструювання гібридом. В якості альтернативи, можна клонувати наївний репертуар (наприклад, людини) для одержання єдиного джерела антитіл до широкого спектра чужорідних антигенів й аутоантигенів без імунізації, як описано в статті Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Нарешті, наївні бібліотеки можна також одержати шляхом синтезу, клонувати сегменти V-генів стовбурових клітин, що не зазнали реаранжування, і використовуючи ПЛР-праймери, що містять випадкові послідовності, для кодування гіперваріабельної області CDR3 і здійснення реаранжування *in vitro*, як описано в статті Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992). Патентні публікації, в яких описані фагові бібліотеки антитіл людини, включають, наприклад: патент США № 5750373 і патентні публікації США № 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 і 2009/0002360.

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

6. Поліспецифічні антитіла

У деяких варіантах реалізації антитіло, запропоноване у даному документі, являє собою поліспецифічне антитіло, наприклад, біспецифічне антитіло. Поліспецифічні антитіла являють собою моноклональні антитіла, які містять щонайменше два різні сайти специфічного

зв'язування. У деяких варіантах реалізації винаходу один із сайтів специфічного зв'язування відноситься до тау-білка, а інший - до будь-якого іншого антигена. У деяких варіантах реалізації один із сайтів специфічного зв'язування відноситься до тау-білка, а інший - до бета-амілоїду. У деяких варіантах реалізації біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома різними епітопами тау-білка. Крім того, для локалізації цитотоксичних агентів в області клітин, які експресують тау-білок, можна застосовувати біспецифічні антитіла. Біспецифічні антитіла можна одержати у вигляді повнорозмірних антитіл або фрагментів антитіл.

Способи виготовлення поліспецифічних антитіл включають рекомбінантну спільну експресію двох пар важкий ланцюг - легкий ланцюг імуноглобуліну з різною специфічністю (див. Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)), WO 93/08829, і Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991)), й інженерію згідно зі стратегією "виступ-в-западину" (див., наприклад, патент США № 5731168). Поліспецифічні антитіла також можна одержати за допомогою конструювання електростатичних напрямних ефектів для створення Fc-гетеродимерних молекул антитіл (WO 2009/089004A1); перехресного зшивання двох або більше антитіл або фрагментів (див., наприклад, патент США № 4676980, і Brennan et al., Science, 229:81 (1985)); використання лейцинових блискавок для одержання біспецифічних антитіл (див., наприклад, Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); використання технології "діатіл" для виготовлення біспецифічних фрагментів антитіл (див. наприклад, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); і використання одноланцюгових Fv (sFv)-диммерів (див., наприклад, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)); й одержання триспецифічних антитіл, описане, наприклад, в Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991).

Сконструйовані антитіла, що містять три або більше функціональних антигензв'язуючих сайтів, включаючи "антитіла-восьминоги", також включені у даний документ (див., наприклад, US 2006/0025576A1).

У даному документі антитіло або фрагмент також включає "FAb подвійної дії" або "DAF" що містить антигензв'язуючий сайт, що зв'язується з тау-білком, а також з ще одним, який відрізняється від нього, антигеном (див., наприклад, US 2008/0069820).

7. Варіанти антитіл

У деяких варіантах реалізації винаходу розглядаються варіанти амінокислотних послідовностей антитіл, запропонованих у даному документі. Наприклад, може бути бажаним поліпшення спорідненості та/або інших біологічних властивостей антитіла. Варіанти амінокислотних послідовностей антитіла можна одержати шляхом внесення відповідних модифікацій у нуклеотидну послідовність, що кодує антитіло, або шляхом пептидного синтезу. Такі модифікації включають, наприклад, делеції й/або інсерції та/або заміни залишків в амінокислотних послідовностях антитіла. Для одержання кінцевого конструкта можна внести будь-яку комбінацію делецій, інсерцій та заміні за умови, що кінцевий конструкт має бажані характеристики, наприклад, зв'язування з антигеном.

а) Варіанти замін, інсерцій та делецій

У деяких варіантах реалізації пропонуються варіанти антитіл, що містять одну або більше амінокислотні заміни. Сайти, що представляють інтерес для замісного мутагенезу, включають HVR і FR. Консервативні заміни наведені в таблиці 1 під заголовком "переважні заміни". Більше істотні зміни наведені в таблиці 1 під заголовком "типові заміни" і докладно описані нижче щодо класів бічного ланцюга амінокислот. У досліджуване антитіло можна впровадити амінокислотні заміни і досліджувати продукти за допомогою скринінгу на предмет бажаної активності, наприклад, збереження/поліпшення зв'язування антигена, зниження імуногенності або поліпшення ADCC або CDC.

Таблиця 1

Первісний залишок	Типові заміни	Переважаючі заміни
Ala (A)	Val; Leu; He	Val
Arg (R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn (N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
He (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; He; Val; Met; Ala; Phe	He

Таблиця 1

Первісний залишок	Типові заміни	Переважаючі заміни
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; He	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; He; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	He; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Амінокислоти можна згрупувати за загальними властивостями бічного ланцюга:

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

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

Один тип варіантів, отриманих шляхом заміни, включає заміну одного або більше залишків гіперваріабельної області вихідного антитіла (наприклад, гуманізованого антитіла або антитіла людини). Як правило, отриманий(і) варіант(и), відібрані для подальшого дослідження, характеризуються модифікаціями (наприклад, поліпшенням) певних біологічних властивостей (наприклад, підвищеною спорідненістю, зниженою імуногенністю) у порівнянні з вихідним антитілом і/або в значній мірі зберігають певні біологічні властивості вихідного антитіла. Типовий варіант, отриманий шляхом заміни, являє собою антитіло з дозрілою спорідненістю, яке легко одержати, наприклад, з використанням методик дозрівання спорідненості на основі фагового дисплея, наприклад, описаних у даному документі. Коротенько, один або декілька залишків HVR мутують та варіантні антитіла піддають фаговому дисплею та скринінгу на предмет конкретної біологічної активності (наприклад, спорідненості зв'язування).

Модифікації (наприклад, заміни) можна внести в HVR, наприклад, для поліпшення спорідненості антитіла. Такі модифікації можна внести в "гарячі точки" HVR, тобто залишки, які кодуються кодонами, з високою частотою, що зазнають мутацій під час соматичного дозрівання (див., наприклад, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)), і/або залишки, які контактують з антигеном, при цьому отриманий варіант VH або VL тестують на спорідненість зв'язування. Дозрівання спорідненості шляхом конструювання та повторного відбору з вторинних бібліотек описане, наприклад, в Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). У деяких варіантах реалізації дозрівання спорідненості вносять різноманітність у варіабельні гени, вибрані для дозрівання, будь-яким із різних способів (наприклад, ПЛР зниженої точності, перетасування ланцюгів або олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу). Потім створюють вторинну бібліотеку. Після цього бібліотеку піддають скринінгу з метою ідентифікації будь-яких варіантів антитіл, що мають бажану спорідненість. Ще один спосіб внесення різноманітності включає HVR-спрямовані підходи, в яких рандомізують декілька залишків HVR (наприклад, 4-6 залишків одночасно). Залишки HVR, що беруть участь у зв'язуванні антигена, можна специфічно визначити, наприклад, за допомогою мутагенезу з аланіновим скануванням або моделювання. Зокрема, мішенями часто є CDR-H3 і CDR-L3.

У деяких варіантах реалізації винаходу заміни, інсерції або делеції можуть виникати в одній або більше HVR за умови, що такі модифікації по суті не знижують здатність антитіла до зв'язування антигена. Наприклад, в HVR можна ввести консервативні модифікації (наприклад, консервативні заміни, як запропоновано у даному документі), які не знижують спорідненість у значній мірі. Такі зміни можуть бути, наприклад, за межами контактуючих з антигеном залишків в HVR. У деяких варіантах реалізації варіантів VH- і VL-послідовностей, запропонованих вище, кожна HVR є немодифікованою або містить не більше однієї, двох або трьох амінокислотних замін.

Підходящий спосіб для ідентифікації залишків або областей антитіла, які можуть бути мішенями для мутагенезу, називається "аланін-скануючим мутагенезом", як описано в статті Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. У даному способі виявляють залишок або групу залишків-мішеней (наприклад, заряджених залишків, наприклад, arg, asp, his, lys і glu) і заміщають їх нейтральними або негативно зарядженими амінокислотами (наприклад, аланіном або поліаланіном) з метою визначити, чи впливає це на взаємодію антитіла з антигеном. В амінокислотні положення, що демонструють функціональну чутливість до первісної заміни, можна ввести подальші заміни. В альтернативному або додатковому варіанті формують кристалічну структуру антиген-антитіло для ідентифікації точок контакту між антитілом й антигеном. Такі контактні залишки і сусідні залишки можна піддавати спрямованому впливу або виключати з кандидатів для заміни. Варіанти можна піддавати скринінгу з метою визначення наявності в них бажаних властивостей.

Інсерції в амінокислотну послідовність включають N- і/або C-кінцеві гібриди довжиною від одного залишку до поліпептидів, що містять сто або більше залишків, а також інсерції одного або множини амінокислотних залишків усередині послідовності. Приклади кінцевих інсерцій включають антитіло з N-кінцевим залишком метіоніну. Інші інсерційні варіанти молекули антитіла включають приєднання до N- або C-кінця антитіла ферменту (наприклад, для ADEPT) або поліпептиду, що збільшує період напівжиття антитіла в сироватці.

b) Варіанти глікозилювання

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

Якщо антитіло містить Fc-область, то можна модифікувати вуглевод, приєднаний до неї. Нативні антитіла, які продукуються клітинами ссавців, зазвичай містять розгалужений двохантенарний олігосахарид, зазвичай приєднаний за допомогою N-зв'язку до Asn297 у CH2-доміні Fc-області. Див., наприклад, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). Зазначений олігосахарид може містити різні вуглеводи, наприклад, маннозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу та сіалову кислоту, а також фукозу, приєднану до GlcNAc в "стеблі" двохантенарної олігосахаридної структури. У деяких варіантах реалізації можна виконати модифікації олігосахариду в антитілі згідно з даним винаходом з метою створення варіантів антитіл з певними поліпшеними властивостями.

У деяких варіантах реалізації винаходу запропоновані варіанти антитіл, що містять вуглеводну структуру з недостатньою кількістю фукози, приєднаної (безпосередньо або побічно) до Fc-області. Наприклад, кількість фукози в такому антитілі може становити від 1 % до 80 %, від 1 % до 65 %, від 5 % до 65 % або від 20 % до 40 %. Кількість фукози визначають шляхом розрахунку середньої кількості фукози у вуглеводному ланцюзі при Asn297 щодо суми всіх вуглеводних структур, приєднаних до Asn 297 (наприклад, складних гібридних структур з високим вмістом маннози), виміряної за допомогою MALDI-TOF-мас-спектрометрії, як описано, наприклад, у WO 2008/077546. Asn297 відноситься до залишку аспарагіну, розташованого приблизно у положенні 297 в Fc-області (ЕС-нумерація залишків Fc-області); проте, Asn297 також може бути розташований на відстані приблизно ± 3 амінокислот до або після положення 297, тобто, між положеннями 294 і 300, враховуючи незначні варіації послідовності в антитілах. Такі варіанти фукозилювання можуть мати поліпшену ADCC-функцію. Див., наприклад, патентні публікації США № US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Приклади публікацій, пов'язаних з "дефукозилюваними" або "фукозодефіцитними" варіантами антитіла, включають: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004). Приклади ліній клітин, здатних продукувати дефукозилювані антитіла, включають клітини Lec13 CHO, дефектні за фукозилюванням білків (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); патентна заявка США № US 2003/0157108 A1, Presta, L.; і WO 2004/056312 A1, Adams et al., особливо Приклад 11), і лінії клітин з нокаутом, наприклад, клітини CHO з нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферази FUT8, (див., наприклад, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); і WO2003/085107).

Крім того, запропоновані варіанти антитіл з олігосахаридами, розділеними навпіл, наприклад, у яких двохантенарний олігосахарид, приєднаний до Fc-області антитіла, розділений

за GlcNAc. Такі варіанти антитіл можуть характеризуватися зниженим фукозилюванням і/або поліпшеною ADCC-функцією. Приклади таких варіантів антитіл описані, наприклад, у WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патент США № 6602684 (Umana et al.); і US 2005/0123546 (Umana et al.). Крім того, запропоновані варіанти антитіл із щонайменше одним залишком галактози в олігосахариді, приєднаному до Fc-області. Такі варіанти антитіл можуть мати поліпшену CDC-функцію. Такі варіанти антитіл описані, наприклад, у WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); і WO 1999/22764 (Raju, S.).

с) Варіанти Fc-області

У деяких варіантах реалізації винаходу в Fc-область антитіла, запропонованого у даному документі, можна ввести одну або більше з амінокислотних модифікацій, тим самим одержуючи варіант Fc-області. Варіант Fc-області може містити послідовність Fc-області людини (наприклад, Fc-області IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини) амінокислотну модифікацію, що містить (наприклад, заміну) в одному або більше амінокислотних положеннях.

У деяких варіантах реалізації даного винаходу розглянутий варіант антитіла, що має деякі, але не всі ефекторні функції, що робить його бажаним кандидатом для варіантів застосування, при яких важливий період напівжиття антитіла *in vivo*, а деякі ефекторні функції (наприклад, комплемент й ADCC) не потрібні або шкідливі. Для підтвердження зниження/ослаблення CDC-й/або ADCC-активності можна виконати аналіз цитотоксичності *in vitro* й/або *in vivo*. Наприклад, щоб переконатися у відсутності зв'язування антитіла з FcγR (і, отже, відсутності ADCC-активності) при збереженні здатності зв'язування з FcRn можна виконати аналіз зв'язування Fc-рецептора (FcR). Основні опосередковуючі ADCC клітини - NK-клітини - експресують тільки FcγRIII, у той час як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Зведена інформація про експресію FcR на кровотворних клітинах наведена в Таблиці 3 на сторінці 464 статті Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)). Необмежуючі приклади аналізу *in vitro* для оцінки ADCC-активності досліджуваної молекули описані у патенті США № 5500362 (див., наприклад, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) і Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5821337 (див. Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). В альтернативному варіанті можна використовувати аналізи, не пов'язані з використанням радіоактивних речовин (див., наприклад, аналіз цитотоксичності АСТІ™ для проточної цитометрії без використання радіоактивних речовин (CellTechnology, Inc. Маунтін-в'ю, штат Каліфорнія, США; й аналіз цитотоксичності CytoTox96® без використання радіоактивних речовин (Promega, Медісон, штат Вісконсін, США). Ефекторні клітини, придатні для такого аналізу, включають мононуклеари периферичної крові (МКПК) і природні кілери (NK). В альтернативному або додатковому варіанті ADCC-активність речовини, що представляє інтерес, можна оцінити *in vivo*, наприклад, на тваринній моделі, наприклад, описаній у публікації Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Крім того, можна виконати аналіз зв'язування C1q з метою підтвердження нездатності антитіла зв'язувати C1q і, отже, відсутності CDC-активності. Див., наприклад, твердофазний ІФА зв'язування C1q і C3c у WO 2006/029879 і WO 2005/100402. Для оцінки активації комплементу можна виконати аналіз CDC (див., наприклад, Gazzano-Santoro et al. *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); і Cragg, M.S. and M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Крім того, можна визначити зв'язування та виведення/період напівжиття FcRn *in vivo* з використанням способів, відомих в даній області техніки (див., наприклад, Petkova, S. B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

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

Описані деякі варіанти антитіл з поліпшеним або зменшеним зв'язуванням з FcR. (див., наприклад, патент США № 6737056; WO 2004/056312, і Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)).

У деяких варіантах реалізації варіант антитіла містить Fc-область з однією або більше амінокислотними замінами, що поліпшують ADCC, наприклад, замінами у положеннях 298, 333 і 334 Fc-області (ЕС-нумерація залишків).

У деяких варіантах реалізації вносять зміни в Fc-область, що призводить до зміни (тобто поліпшення або зниження) зв'язування C1q і/або комплемент-залежної цитотоксичності (CDC), наприклад, як описано у патенті США № 6194551, WO 99/51642 й Idusogie et al. *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

Антитіла зі збільшеним періодом напівжиття та поліпшеним зв'язуванням з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), який відповідає за передачу IgG матері плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) і Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описані в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Зазначені антитіла містять Fc-область з однією або більше замінами, які поліпшують зв'язування Fc-області з FcRn. Такі варіанти Fc включають варіанти із замінами одного або більше залишків Fc-області: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 або 434, наприклад, заміною залишку 434 Fc-області (патент США № 7371826).

Інші приклади варіантів Fc-області див. також в Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); патенті США № 5648260; патенті США № 5624821; і заявці WO 94/29351, що стосується інших прикладів варіантів Fc-області.

d) Варіанти антитіл, створені шляхом введення цистеїну

У деяких варіантах реалізації може бути бажаним створення антитіл, сконструйованих з використанням залишків цистеїну, наприклад, "thioMAb", у яких один або більше залишків антитіла заміщені залишками цистеїну. У конкретних варіантах реалізації винаходу заміщені залишки розташовані в доступних сайтах антитіла. У результаті заміщення зазначених залишків цистеїном у доступних ділянках антитіла розташовуються реакційноздатні тиольні групи, які можна використовувати для кон'югування антитіла з іншими групами, наприклад, лікарськими речовинами або групами "лінкер-лікарська речовина" з одержанням імунокон'югату, як додатково описано у даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу можна замінити на цистеїн один або більше з наступних залишків: V205 (нумерація за Kabat) легкого ланцюга; A118 (ЕС-нумерація) важкого ланцюга; і S400 (ЕС-нумерація) Fc-області важкого ланцюга. Антитіла, сконструйовані з використанням залишків цистеїну, можна одержати, як описано, наприклад, у патенті США № 7521541.

e) Похідні антитіл

У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло, запропоноване у даному документі, можна додатково модифікувати шляхом введення додаткових небілкових фрагментів, відомих в даній області техніки і легко доступних. Фрагменти, придатні для одержання похідних антитіла, включають водорозчинні полімери, але не обмежуються ними. Необмежуючі приклади водорозчинних полімерів включають поліетиленгліколь (ПЕГ), співполімери етиленгліколя та пропіленгліколя, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилену/малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (гомополімери або випадкові співполімери) і декстран або полі(п-вінілпіролідон)поліетиленгліколь, гомополімери пропіленгліколя, співполімери пропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксietиловані поліоли (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт й їх суміші, але не обмежуються ними. Пропіоновий альдегід поліетиленгліколя може мати переваги при виробництві через його стабільність у воді. Зазначений полімер може мати будь-яку молекулярну масу та бути розгалуженим або нерозгалуженим. Кількість молекул полімеру, приєднаних до антитіла, може мінятися, і при приєднанні більше ніж одного полімеру вони можуть являти собою однакові або різні молекули. У цілому, кількість та/або тип полімерів, які застосовують для одержання похідних, можна визначити з урахуванням факторів, що включають конкретні властивості або функції антитіл, що підлягають поліпшенню, можливість застосування похідних антитіла в терапії за певних умов і т. п., але не обмежуваних цим.

В ще одному варіанті реалізації винаходу пропонуються кон'югати антитіла та небілкового фрагмента, які можна селективно нагрівати за допомогою опромінення. В одному варіанті реалізації небілковий фрагмент являє собою вуглецеву нанотрубку (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005)). Довжина хвилі випромінювання може бути будь-якою та включає довжини хвиль, що не ушкоджують звичайні клітини, але нагрівають небілковий фрагмент до температури, що викликає загибель клітин, розташованих поблизу від антитіла з небілковим фрагментом.

В. Рекombінантні методи і композиції

Антитіла можна одержати з використанням рекombінантних методик і композицій, наприклад, як описано у патенті США № 4816567. У деяких варіантах реалізації запропонована виділена нуклеїнова кислота, що кодує антитіло проти тау-білка, описане у даному документі. Така нуклеїнова кислота може кодувати амінокислотну послідовність, що містить VL, і/або амінокислотну послідовність, що містить VH антитіла (наприклад, легкий та/або важкий ланцюги антитіла). У додатковому варіанті реалізації запропоновані один або більше векторів (наприклад, експресійних векторів), що містять таку нуклеїнову кислоту. У додатковому варіанті реалізації запропонована клітина-хазяїн, що містить таку нуклеїнову кислоту. В одному з таких варіантів реалізації клітина-хазяїн містить (наприклад, трансформована): (1) вектор, що містить

нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить VL антитіла, і амінокислотну послідовність, що містить VH антитіла, або (2) перший вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить VL антитіла, і другий вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить VH антитіла. У деяких варіантах реалізації винаходу клітина-хазяїн є еукаріотичною, наприклад, клітиною яєчника китайського хом'яка (CHO) або лімфоїдною клітиною (наприклад, клітиною Y0, NS0, Sp20). У деяких варіантах реалізації запропонований спосіб одержання антитіла проти тау-білка, причому зазначений спосіб включає культивування клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло, запропоноване вище, в умовах, придатних для експресії антитіла, і, у деяких випадках, виділення антитіла з клітини-хазяїна (або середовища, в якому культивують клітину-хазяїна).

Для рекомбінантної продукції антитіла проти тау-білка нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло, наприклад, як описано вище, є виділеною та вставлена в один або більше векторів для подальшого клонування й/або експресії в клітині-хазяїні. Таку нуклеїнову кислоту легко виділити і секвенувати з використанням загальноприйнятих процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, здатних специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла).

Клітини-хазяїни, придатні для клонування або експресії векторів, які кодують антитіло, включають прокаріотичні або еукаріотичні клітини, описані у даному документі. Наприклад, антитіла можна продукувати у бактеріях, зокрема, якщо глікозилювання та Fc-ефекторні функції не є необхідними. Експресію фрагментів антитіла та поліпептидів у бактеріях див., наприклад, у патентах США № 5648237, 5789199 і 5840523. (Див. також Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, де описана експресія фрагментів антитіла в *E. coli*). Після експресії антитіла можна виділити з бактеріальної біомаси в розчинну фракцію та піддавати подальшому очищенню.

На додаток до прокаріотів, хазяїнами, придатними для клонування або експресії векторів, які кодують антитіло, є еукаріотичні мікроорганізми, наприклад, міцеліальні гриби або дріжджі, у тому числі штами грибів і дріжджів з "гуманізованими" шляхами глікозилювання, які дозволяють одержувати антитіло з частково або повністю людською моделлю глікозилювання. Див. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) і Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

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

Крім того, в якості хазяїнів можна використовувати культури клітин рослин. Див., наприклад, патенти США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 і 6417429 (де описана технологія PLANTIBODIES™ для продукції антитіл у трансгенних рослинах).

Крім того, в якості хазяїнів можна використовувати клітини хребетних. Наприклад, можна використовувати лінії клітин ссавців, адаптовані до росту в суспензії. Інші приклади підходящих ліній клітин-хазяїнів ссавців являють собою лінію клітин нирки мавпи CV1, трансформованих SV40 (COS-7); ембріональну лінію клітин нирки людини (клітини 293 або 293, як описано, наприклад, у статті Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клітини нирки дитинчати хом'яка (BHK); клітини Сертолі миші (клітини TM4, як описано, наприклад, у статті Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клітини нирки мавпи (CV1); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирки собаки (MDCK); клітини печінки пацюка лінії buffalo (BRL 3A); клітини легень людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, як описано, наприклад, у статті Mather et al. *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клітини MRC 5; і клітини FS4. Інші підходящі лінії клітин-хазяїнів ссавців включають клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), у тому числі клітини DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); і лінії мієломних клітин, наприклад, Y0, NS0 і Sp2/0. Огляд деяких ліній клітин-хазяїнів ссавців, придатних для продукції антитіл, див., наприклад, в Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

С. Аналізи

Антитіла проти тау-білка, запропоновані у даному документі, можна ідентифікувати, піддавати скринінгу або дослідженню їх фізичних/хімічних властивостей та/або біологічної активності за допомогою різних аналізів, відомих в даній області техніки.

1. Аналізи зв'язування та інші аналізи

В одному аспекті досліджують антигензв'язуючу активність антитіла згідно з даним винаходом, наприклад, за допомогою відомих способів, наприклад, твердофазного ІФА, вестерн-блоттингу та т. п.

В ще одному аспекті для виявлення антитіла, що конкурує з антитілом, описаним у даному документі, за зв'язування з тау-білком, можна використовувати конкурентні аналізи. У деяких варіантах реалізації таке конкуруюче антитіло зв'язується з тим самим епітопом (наприклад, лінійним або конформаційним епітопом), який зв'язує антитіла 37D3-H9, hu37D3-H9.v28.A4, hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 або hu37D3-H9.v93. Докладні типові способи картування епітопу, з яким зв'язується антитіло, представлені в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

У типовому конкурентному аналізі іммобілізований тау-білок (наприклад, мономерний тау-білок) інкубують у розчині, що містить перше мічене антитіло, яке зв'язується з тау-білком (наприклад, будь-яке з антитіл, описаних у даному документі, таких як hu37D3-H9.v28.A4), і друге немічене антитіло, яке тестоване на предмет здатності конкурувати з першим антитілом за зв'язування з тау-білком. Друге антитіло може бути присутнім у супернатанті гібридоми. В якості контролю іммобілізований тау-білок інкубують у розчині, що містить перше мічене антитіло, але не містить друге немічене антитіло. Після інкубування в умовах, що допускають зв'язування першого антитіла з тау-білком, видаляють надлишок незв'язаного антитіла та вимірюють кількість мітки, пов'язаної з іммобілізованим тау-білком. Якщо кількість мітки, пов'язаної з іммобілізованим тау-білком, суттєво знижена в аналізованому зразку у порівнянні з контрольним зразком, то це вказує на те, що друге антитіло конкурує з першим антитілом за зв'язування з тау-білком. Див. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Аналізи активності

В одному аспекті запропоновані аналізи для ідентифікації антитіл проти тау-білка (наприклад, проти будь-якої форми тау-білка), що мають біологічну активність. Біологічна активність може включати, наприклад, зв'язування таких антитіл з множинними формами тау-білка (наприклад, мономерним тау-білком, олігомерним тау-білком, нефосфорилованим тау-білком і фосфорилованим тау-білком) та зниження рівня тау-білка (наприклад, загального тау-білка, загального розчинного тау-білка, розчинного нефосфорилизованого тау-білка, розчинного фосфорилизованого тау-білка, загального нерозчинного тау-білка, нерозчинного нефосфорилизованого тау-білка, нерозчинного фосфорилизованого тау-білка, гіперфосфорилизованого тау-білка або парних спіральних філаментів, що містять гіперфосфорилований тау-білок, у головному мозку, наприклад, у корі головного мозку та/або гіпокампі). У даному винаході також запропоновані антитіла, що мають таку біологічну активність *in vivo* й/або *in vitro*.

У деяких варіантах реалізації антитіло згідно з даним винаходом тестують на предмет такої біологічної активності. Наприклад, для виявлення зв'язування антитіл проти тау-білка у відділах головного мозку та, наприклад, з нейрофібрилярними клубками у головному мозку трансгенних мишей можна використовувати тваринну модель таупатії, наприклад, тау-трансгенних мишей (наприклад, P301L). Крім того, тваринну модель таупатії, наприклад, тау-трансгенних мишей (наприклад, P301L), можна обробити антитілами проти тау-білка, і для оцінки здатності такої обробки знижувати рівень тау-білка (наприклад, загального тау-білка, загального розчинного тау-білка, розчинного фосфорилизованого тау-білка, розчинного нефосфорилизованого тау-білка, загального нерозчинного тау-білка, нерозчинного фосфорилизованого тау-білка, нерозчинного нефосфорилизованого тау-білка, гіперфосфорилизованого тау-білка або парних спіральних філаментів, що містять гіперфосфорилований тау-білок) у головному мозку миші (наприклад, в корі головного мозку та/або гіпокампі) можна використовувати експериментальні методики, відомі в даній області техніки.

D. Імунокон'югати

У даному винаході також запропоновані імунокон'югати, що містять антитіло проти тау-білка, описане у даному документі, кон'юговане з одним або більше терапевтичними агентами або радіоактивними ізотопами.

У деяких варіантах реалізації винаходу імунокон'югат містить антитіло, описане у даному документі та кон'юговане з радіоактивним атомом з утворенням радіокон'югату. Для одержання радіокон'югатів доступні різноманітні радіоактивні ізотопи. Приклади включають At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} і радіоактивні ізотопи Lu. У випадку, якщо імунокон'югат застосовують для виявлення, він може містити радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад, ^{99m}Tc або ^{1123}In , або спінову мітку для візуалізації за допомогою ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (також відомої як магнітно-резонансна візуалізація, МРВ),

наприклад, йод-123, йод-131, індій-111, фтор-18, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

Кон'югати антитіла можна виготовити, використовуючи різноманітні біфункціональні білок-зв'язуючі агенти, наприклад, N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоєфірів (наприклад, диметиладипімідат HCl), активні ефіри (наприклад, дисукцинімідилсуберат), альдегіди (наприклад, глутаральдегід), біс-азидосполуки (наприклад, біс-(p-азидобензоїл) гександіамін), похідні біс-діазонія (наприклад, біс-(p-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанати (наприклад, толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (наприклад, 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, рициновий імунотоксин можна одержати, як описано в роботі Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). 1-Ізотіоціанатбензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA), мічена вуглецем-14, являє собою типовий хелатуючий агент для кон'югування радіонуклеотиду з антитілом. Див. WO94/11026. Лінкер може являти собою "відщеплюваний лінкер", що полегшує вивільнення цитотоксичної лікарської речовини в клітині. Наприклад, можна використовувати кислоточутливий лінкер, пептидазочутливий лінкер, фоточутливий лінкер, диметильний лінкер або дисульфід-вмісний лінкер (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); патент США № 5208020).

Під імунокон'югатами або ADC у даному документі безпосередньо розуміють такі кон'югати, отримані за допомогою перехресно зшиваючих реагентів, включаючи BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC і сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), які доступні для придбання (наприклад, у Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, штат Іллінойс, США), але не обмежуючись ними.

Е. Способи та композиції для діагностики і виявлення

У деяких варіантах реалізації винаходу будь-яке з антитіл проти тау-білка, запропонованих у даному керівництві, можна застосовувати для виявлення наявності тау-білка у біологічному зразку. У даному документі термін "виявлення" ("детекція") охоплює кількісне або якісне виявлення. У деяких варіантах реалізації біологічний зразок містить клітину або тканину, наприклад, цереброспинальну рідину, клітину або тканину головного мозку (наприклад, кори головного мозку або гіпокампа) або кров. У деяких варіантах реалізації біологічний зразок являє собою цереброспинальну рідину.

У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування в способі діагностики або виявлення. У додатковому аспекті запропонований спосіб виявлення наявності тау-білка у біологічному зразку. У деяких варіантах реалізації спосіб включає приведення біологічного зразка в контакт з антитілом проти тау-білка, як описано у даному документі, в умовах, що забезпечують зв'язування антитіла проти тау-білка з тау-білком, і виявлення утворення комплексу антитіла проти тау-білка з тау-білком. Такий спосіб можна здійснювати *in vitro* або *in vivo*. Потім комплекс, утворений антитілом проти тау-білка та тау-білком у тестованому біологічному зразку, можна порівняти з комплексом, утвореним у контрольному біологічному зразку (наприклад, біологічному зразку здоровішого суб'єкта або суб'єктів). Кількість комплексу, утвореного антитілом проти тау-білка та тау-білком у тестованому біологічному зразку, також можна кількісно оцінити і порівняти з кількістю комплексу, утвореного у контрольному біологічному зразку (наприклад, біологічному зразку здоровішого суб'єкта або суб'єктів) або з середньою кількістю комплексу, що свідомо утворюється у здоровіших суб'єктів.

У деяких варіантах реалізації антитіло проти тау-білка застосовують для вибору суб'єктів, що підходять для лікування за допомогою антитіла проти тау-білка, наприклад, коли тау-білок є біомаркером для відбору пацієнтів. Наприклад, у деяких варіантах реалізації антитіло проти тау-білка (наприклад, проти будь-яких форм тау-білка) використовується для виявлення наявності захворювання або розладу, пов'язаного з тау-білком, у суб'єкта, або наявності високого ризику (або схильності) до захворювання або розладу, пов'язаного з тау-білком, у суб'єкта.

Типові захворювання або розлади, які можна діагностувати за допомогою антитіла згідно з даним винаходом, включають захворювання або розлади, асоційовані з тау-білком, і захворювання або розлади, викликані або асоційовані з утворенням нейрофібрилярних клубків або нейропільних ниток. У деяких варіантах реалізації захворювання або розлади, які можна діагностувати за допомогою антитіла згідно з даним винаходом, включають захворювання або розлади, асоційовані з тау-білком, які проявляються порушенням або втратою когнітивних функцій, у тому числі логічного мислення, здатності до прийняття ситуаційних розв'язків, емоції пам'яті, навченості та/або специфічної навігації. Зокрема, захворювання або розлади, які можна

діагностувати за допомогою антитіла згідно з даним винаходом, включають таупатії, наприклад, нейродегенеративні таупатії. У деяких варіантах реалізації захворювання або розлади, які можна діагностувати за допомогою антитіла згідно з даним винаходом, включають хворобу Альцгеймера, хворобу Крейтцфельда-Якоба, деменцію боксерів, синдром Дауна, хворобу Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозит з включеними тільцями, пріон-протеїноцеребральну амілоїдну ангіопатію, черепно-мозкову травму, бічний аміотрофічний склероз/комбінацію паркінсонізму та деменції (комплекс Гуама), негуамську хворобу рухового нейрона з нейрофібрилярними клубками, деменцію аргірофільних зерен, кортикобазальну дегенерацію, дифузійні нейрофібрилярні клубки з кальцифікацією, лобово-скроневу деменцію, лобово-скроневу деменцію з паркінсонізмом, зчеплену з 17 хромосомою, хворобу Галервордена-Шпатца, множинну системну атрофію, хворобу Німанна-Піка типу С, палідо-пonto-нігральну дегенерацію, хворобу Піка, прогресуючий субкортикальний гліоз, прогресуючий над'ядерний параліч, підгострий склерозуючий паненцефаліт, деменцію з перевагою нейрофібрилярних клубків, постенцефалітичний паркінсонізм і міотонічну дистрофію, але не обмежуються ними.

Додаткові необмежуючі типові захворювання та розлади, які можна діагностувати за допомогою антитіла згідно з даним винаходом, включають ПБТ (первинну вікову таупатію), деменцію з перевагою нейрофібрилярних клубків, підгостру склерозуючу паненцефалопатію, хронічну травматичну енцефалопатію (ХТЕ), таупатію білої речовини з включеннями кулькоподібних гліалів, деменцію з тільцями Леві (ДТЛ), легке когнітивне порушення (ЛКП), глаукому, сімейну британську деменцію, сімейну датську деменцію, гваделупський паркінсонізм, нейродегенерацію з відкладенням заліза в головному мозку, SLC9A6-пов'язану розумову відсталість, множинний склероз, ВІЛ-пов'язану деменцію, старечий амілоїдоз серця та хворобу Гантінгтона. У деяких варіантах реалізації розлад, який можна діагностувати із застосуванням антитіла згідно з даним винаходом, являє собою хворобу Альцгеймера (ХА).

У деяких варіантах реалізації запропоновані мічені антитіла проти тау-білка. Мітки включають мітки або групи, що виявляються прямим способом (наприклад, флуоресцентні, хромофорні, електронно-щільні, хемілюмінесцентні та радіоактивні мітки), а також такі групи, як ферменти або ліганди, що виявляються непрямим способом, наприклад, за допомогою ферментативної реакції або молекулярних взаємодій, але не обмежуються ними. Типові мітки включають радіоізотопи ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H і ^{131}I , флуорофори, такі як хелати рідкісноземельних елементів або флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, дансил, умбеліферон, люциферази, наприклад, люциферазу світлячка та бактеріальну люциферазу (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофталазиндіони, пероксидазу хрону (ПХ), лужну фосфатазу, р-галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, оксидази вуглеводів, наприклад, глюкозооксидазу, галактозооксидазу та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, оксидази гетероциклічних сполук, таких як уриказа та ксантинооксидаза, у комбінації з ферментом, який використовує пероксид водню для окиснення попередника барвника, наприклад, ПХ, лактопероксидазу або мікропероксидазу, біотин/авідин, спінові мітки, мітки-бактеріофаги, стабільні вільні радикали та т. п., але не обмежуються ними.

40 F. Фармацевтичні складки

Фармацевтичні складки антитіла проти тау-білка, описані у даному документі, отримують шляхом змішування такого антитіла, що має бажаний ступінь чистоти, з одним або більше необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, розріджувачами і/або допоміжними речовинами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), у вигляді ліофілізованих складів або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії, розріджувачі та допоміжні речовини зазвичай є нетоксичними для реципієнтів у використовуваних дозуваннях і концентраціях, і включають: стерильну воду, буферні речовини, наприклад, фосфат, цитрат й інші органічні солі; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (наприклад, хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію; хлорид бензетонію; фенол; бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, наприклад, метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; і т-кресол); низькомолекулярні (що містять менше 10 залишків) поліпептиди; білки, наприклад, сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, наприклад, полівінілпіролідон; амінокислоти, наприклад, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, маннозу або декстрини; хелатуючі агенти, наприклад, ЕДТА; вуглеводи, наприклад, сахарозу, манніт, трегалозу або сорбіт; солеутворюючі протиіони, наприклад, натрію; металовмісні комплекси (наприклад, комплекси Zn-білок) і/або неіоногенні ПАВ, наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ), але не обмежуються ними. Приклади фармацевтично прийнятних носіїв у даному документі додатково включають агенти, що забезпечують внутрішньотканинний розподіл лікарських

засобів, наприклад, розчинні нейтрально-активні глікопротеїни, що містять гіалуронідазу (sHASEGP), наприклад, розчинні глікопротеїни PH-20 людини, що містять гіалуронідазу, наприклад, rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Деякі типові sHASEGP, у тому числі rHuPH20, і способи їх застосування описані у патентних публікаціях США № 2005/0260186 і 2006/0104968. В одному з аспектів sHASEGP поєднують з одним або більше додатковими глікозаміногліканазами, наприклад, хондроїтиназами.

Типові ліофілізовані складки антитіл описані у патенті США № 6267958. Водні складки антитіла включають складки, описані у патенті США № 6171586 і WO2006/044908, причому останні складки містять гістидин-ацетатний буфер.

Склад, описаний у даному документі, також може містити більше одного активного інгредієнта, якщо це необхідно для лікування за конкретними показниками, переважно, інгредієнти з взаємодоповнюючими активностями, що не виявляють небажаної дії один на одного. Такі активні інгредієнти присутні в комбінації в кількостях, ефективних для поставленої мети.

Активні інгредієнти можна включити в мікрокапсули, отримані, наприклад, за допомогою методик коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, мікрокапсули гідроксиметилцелюлози або желатину та поліметилметакрилату, відповідно, у колоїдні системи доставки ліків (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемulsії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемulsії. Такі методи описані в Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можна одержувати препарати з уповільненим вивільненням. Підходящі приклади препаратів з уповільненим вивільненням включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, причому зазначені матриці знаходяться у формі формованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул.

Композиції, призначені для застосування *in vivo*, зазвичай є стерильними. Стерильності легко досягти, наприклад, шляхом фільтрації через мембрани для стерильної фільтрації.

G. Терапевтичні способи та композиції

Будь-яке з антитіл проти тау-білка, запропонованих у даному документі, можна застосовувати в терапевтичних способах.

В одному аспекті запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування як лікарський засіб. У додаткових аспектах запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування при лікуванні захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування при лікуванні захворювань або розладів, викликаних або асоційованих з утворенням нейрофібрилярних клубків або нейропільних ниток. У конкретних варіантах реалізації запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування при лікуванні таупатії, наприклад, нейродегенеративної таупатії. Типові захворювання або розлади, асоційовані з тау-білком, які можна лікувати із застосуванням антитіл проти тау-білка, включають, без обмеження, хворобу Альцгеймера, бічний аміотрофічний склероз, хворобу Паркінсона, хворобу Крейтцфельда-Якоба, деменцію боксерів, синдром Дауна, хворобу Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозит з включеними тільцями, пріон-протеїнцеребральну амілоїдну ангіопатію, черепно-мозкову травму, бічний аміотрофічний склероз/комбінацію паркінсонізму та деменції (комплекс Гуама), негуамську хворобу рухового нейрона з нейрофібрилярними клубками, деменцію аргірофільних зерен, кортикобазальну дегенерацію, дифузійні нейрофібрилярні клубки з кальцифікацією, лобово-скроневу деменцію, лобово-скроневу деменцію з паркінсонізмом, зчеплену з 17 хромосою, хворобу Галервордена-Шпатца, множинну системну атрофію, хворобу Німанна-Піка типу С, палідопonto-нігральну дегенерацію, хворобу Піка, прогресуючий субкортикальний гліоз, прогресуючий над'ядерний параліч, підгострий склерозуючий паненцефаліт, деменцію з перевагою нейрофібрилярних клубків, постенцефалітичний паркінсонізм і міотонічну дистрофію. Додаткові типові захворювання та розлади, що асоційовані з тау-білком, які можна лікувати за допомогою антитіл проти тау-білка, включають, без обмеження, ПБТ (первинну вікову таупатію), деменцію з перевагою нейрофібрилярних клубків, підгостру склерозуючу паненцефалопатію, хронічну травматичну енцефалопатію (ХТЕ), таупатію білої речовини з включеннями кулькоподібних гліалів, деменцію з тільцями Леві (ДТЛ), легке когнітивне порушення (ЛКП), глаукому, сімейну британську деменцію, сімейну датську деменцію, гваделупський паркінсонізм, нейродегенерацію з відкладенням заліза в головному мозку, SLC9A6-пов'язану розумову відсталість, множинний склероз, ВІЛ-пов'язану деменцію, старечий амілоїдоз серця та хворобу Гантінгтона. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування при лікуванні хвороби Альцгеймера (ХА). У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування при лікуванні помірної ХА, легкої або

помірної ХА, ранніх стадій ХА або продромальної ХА. Крім того, захворювання або розлади, які можна лікувати за допомогою антитіла проти тау-білка, включають захворювання або розлади, які проявляються порушенням або втратою когнітивних функцій, у тому числі логічного мислення, здатності до прийняття ситуаційних розв'язків, ємності пам'яті, навченості та/або специфічної навігації. У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування в способі лікування. У деяких варіантах реалізації винаходу запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування в способі лікування індивіда з одним із вищеописаних захворювань або розладів, асоційованих з тау-білком, що включає введення індивіду ефективної кількості антитіла проти тау-білка. В одному з таких варіантів реалізації спосіб додатково включає введення індивіду ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, наприклад, як описано нижче.

У деяких варіантах реалізації антитіло згідно з даним винаходом застосовують для лікування індивіда з бальною оцінкою MMSE від 20 до 30, від 20 до 26, від 24 до 30, від 21 до 26, від 22 до 26, від 22 до 28, від 23 до 26, від 24 до 26 або від 25 до 26 балів. У деяких варіантах реалізації бальна оцінка MMSE у пацієнта становить від 22 до 26 балів. У деяких документах бальна оцінка MMSE між двома числами включає числа, що знаходяться на кожному кінці зазначеного діапазону. Наприклад, бальна оцінка MMSE між 22 і 26 балами включає бальні оцінки MMSE, рівні 22 і 26 балам.

У деяких варіантах реалізації антитіла згідно з даним винаходом застосовують для лікування індивіда, що є "амілоїд-позитивним", наприклад, пацієнта з відкладаннями тау-білка у головному мозку, типовими для розладів, асоційованих з тау-білком, наприклад, пацієнта з тау-позитивним результатом ПЕТ.

У додаткових варіантах реалізації винаходу запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування при зниженні рівня тау-білка (наприклад, загального тау-білка, загального розчинного тау-білка, розчинного фосфорилизованого тау-білка, загального нерозчинного тау-білка, нерозчинного фосфорилизованого тау-білка, гіперфосфорилизованого тау-білка або парних спіральних філаментів, що містять гіперфосфорилований тау-білок) в індивіда. Наприклад, таке зниження може відбутися у головному мозку (наприклад, корі головного мозку та/або гіпокампі). У деяких варіантах реалізації винаходу запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування при зниженні рівня фосфорилизованого тау-білка. У деяких варіантах реалізації винаходу запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування при зниженні рівня тау-білка (наприклад, нерозчинного фосфорилизованого тау-білка). У деяких варіантах реалізації запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування при зниженні рівня гіперфосфорилизованого тау-білка. У деяких варіантах реалізації винаходу запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування при зниженні рівня парних спіральних філаментів (наприклад, парних спіральних філаментів, що містять гіперфосфорилований тау-білок) у тканині головного мозку (наприклад, у корі головного мозку та/або гіпокампі). У деяких варіантах реалізації винаходу запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування в способі зниження рівня тау-білка (наприклад, загального тау-білка, загального розчинного тау-білка, розчинного фосфорилизованого тау-білка, загального нерозчинного тау-білка, нерозчинного фосфорилизованого тау-білка, гіперфосфорилизованого тау-білка або парних спіральних філаментів, що містять гіперфосфорилований тау-білок) у головному мозку (наприклад, корі головного мозку та/або гіпокампі) в індивіда, що включає введення індивіду ефективної кількості антитіла проти тау-білка з метою зниження рівня тау-білка. "Індивід" згідно з будь-яким із вищеописаних варіантів реалізації є ссавцем, переважно людиною.

У деяких варіантах реалізації винаходу запропоноване антитіло проти тау-білка для застосування при модуляції рівня тау-білка (наприклад, загального тау-білка, загального розчинного тау-білка, розчинного фосфорилизованого тау-білка, загального нерозчинного тау-білка, нерозчинного фосфорилизованого тау-білка, гіперфосфорилизованого тау-білка або парних спіральних філаментів, що містять гіперфосфорилований тау-білок), наприклад, у головному мозку (наприклад, у корі головного мозку та/або гіпокампі) індивіда.

У додатковому аспекті даного винаходу запропоноване застосування антитіла проти тау-білка при виробництві або виготовленні лікарського засобу. У деяких варіантах реалізації лікарський засіб призначений для лікування захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком. Захворювання або розлад, асоційований з тау-білком, може являти собою захворювання або розлад, викликаний або асоційований з утворенням нейрофібрилярних клубків або нейропільних ниток. У конкретних варіантах реалізації лікарський засіб призначений для лікування таупатії, наприклад, нейродегенеративної таупатії. У конкретних варіантах реалізації лікарський засіб призначений для лікування захворювань або розладів, вибраних із групи, що складається з: хвороби Альцгеймера (ХА), хвороби Крейтцфельда-Якоба, деменції

боксерів, синдрому Дауна, хвороби Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозиту з включеними тільцями, пріон-протеїнцеребральної амілоїдної ангіопатії, черепно-мозкової травми, бічного аміотрофічного склерозу/комбінації паркінсонізму та деменції (комплексу Гуама), негуамської хвороби рухового нейрона з нейрофібрилярними клубками, деменції аргірофільних зерен, кортикобазальної дегенерації, дифузійних нейрофібрилярних клубків з кальцифікацією, лобово-скроневої деменції, лобово-скроневої деменції з паркінсонізмом, зчепленої з 17 хромосою, хвороби Галервордена-Шпатца, множинної системної атрофії, хвороби Німанна-Піка типу С, палідо-пonto-нігральної дегенерації, хвороби Піка, прогресуючого субкортикального гліозу, прогресуючого над'ядерного паралічу, підгострого склерозуючого паненцефаліту, деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, постенцефалітичного паркінсонізму та міотонічної дистрофії. У деяких варіантах реалізації лікарський засіб призначений для лікування захворювань та розладів, які вибрані з ПБТ (первинної вікової таупатії), деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, підгострої склерозуючої паненцефалопатії, хронічної травматичної енцефалопатії (ХТЕ), таупатії білої речовини з включеннями кулькоподібних гліалів, деменції з тільцями Леві (ДТЛ), легкого когнітивного порушення (ЛКП), глаукоми, сімейної британської деменції, сімейної датської деменції, гваделупського паркінсонізму, нейродегенерації з відкладенням заліза в головному мозку, SLC9A6-пов'язаної розумової відсталості, множинного склерозу, ВІЛ-пов'язаної деменції, старечого амілоїдозу серця та хвороби Гантінгтона. У деяких варіантах реалізації лікарський засіб призначений для лікування ХА. У деяких варіантах реалізації лікарський засіб призначений для лікування захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком, яке проявляється порушенням або втратою когнітивної функції, наприклад, логічного мислення, здатності до прийняття ситуаційних розв'язків, ємності пам'яті, навченості та/або специфічної навігації. У додатковому варіанті реалізації лікарський засіб призначений для застосування в способі лікування одного з перерахованих вище захворювань (наприклад, таупатії, наприклад, ХА), що включає введення індивіду з таким захворюванням ефективної кількості лікарського засобу. В одному з таких варіантів реалізації спосіб додатково включає введення індивіду ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, наприклад, як описано нижче.

У додатковому варіанті реалізації лікарський засіб призначений для зниження рівня тау-білка (наприклад, загального тау-білка, загального розчинного тау-білка, розчинного нефосфорилованого тау-білка, розчинного фосфорилованого тау-білка, загального нерозчинного тау-білка, нерозчинного фосфорилованого тау-білка, нерозчинного нефосфорилованого тау-білка, гіперфосфорилованого тау-білка або парних спіральних філаментів, що містять гіперфосфорилований тау-білок). Наприклад, таке зниження рівня тау-білка можна спостерігати у головному мозку (наприклад, корі головного мозку та/або гіпокампі) або цереброспинальної рідини індивіда. У деяких варіантах реалізації лікарський засіб призначений для зниження рівня парних спіральних філаментів. У додатковому варіанті реалізації лікарський засіб призначений для застосування в способі зниження рівня тау-білка (наприклад, загального тау-білка, загального розчинного тау-білка, розчинного фосфорилованого тау-білка, загального нерозчинного тау-білка, нерозчинного фосфорилованого тау-білка, гіперфосфорилованого тау-білка або парних спіральних філаментів, що містять гіперфосфорилований тау-білок) в індивіда, що включає введення індивіду ефективної кількості лікарського засобу з метою зниження рівня тау-білка. "Індивід" згідно з будь-яким із вищеописаних варіантів реалізації є ссавцем, переважно людиною.

У додатковому аспекті даного винаходу запропонований спосіб для лікування захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком. Захворювання або розлад, асоційований з тау-білком, яке можна лікувати у відповідності зі способами, запропонованими у даному документі, включає захворювання або розлади, викликані або асоційовані з утворенням нейрофібрилярних клубків або нейропільних ниток. У конкретних варіантах реалізації винаходу запропонований спосіб лікування таупатії, наприклад, нейродегенеративної таупатії. У специфічних варіантах реалізації винаходу запропонований спосіб лікування захворювання або розладу, вибраного з групи, що складається з: хвороби Альцгеймера, хвороби Крейтцфельда-Якоба, деменції боксерів, синдрому Дауна, хвороби Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозиту з включеними тільцями, пріон-протеїнцеребральної амілоїдної ангіопатії, черепно-мозкової травми, бічного аміотрофічного склерозу/комбінації паркінсонізму та деменції (комплексу Гуама), негуамської хвороби рухового нейрона з нейрофібрилярними клубками, деменції аргірофільних зерен, кортикобазальної дегенерації, дифузійних нейрофібрилярних клубків з кальцифікацією, лобово-скроневої деменції, лобово-скроневої деменції з паркінсонізмом, зчепленої з 17 хромосою, хвороби Галервордена-Шпатца, множинної системної атрофії, хвороби Німанна-Піка типу С, палідо-пonto-нігральної дегенерації, хвороби Піка, прогресуючого субкортикального гліозу,

прогресуючого над'ядерного паралічу, підгострого склерозуючого паненцефаліту, деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, постенцефалітичного паркінсонізму та міотонічної дистрофії. У деяких варіантах реалізації винаходу запропоновані способи лікування захворювань та розладів, які вибрані з ПБТ (первинної вікової таупатії), деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, підгострої склерозуючої паненцефалопатії, хронічної травматичної енцефалопатії (ХТЕ), таупатії білої речовини з включеннями кулькоподібних гліалів, деменції з тільцями Леві (ДТЛ), легкого когнітивного порушення (ЛКП), глаукоми, сімейної британської деменції, сімейної датської деменції, гваделупського паркінсонізму, нейродегенерації з відкладенням заліза в головному мозку, SLC9A6-пов'язаної розумової відсталості, множинного склерозу, ВІЛ-пов'язаної деменції, старечого амілоїдозу серця та хвороби Гантінгтона. У деяких варіантах реалізації винаходу запропонований спосіб лікування хвороби Альцгеймера (ХА). У конкретних варіантах реалізації винаходу запропонований спосіб лікування захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком, яке проявляється порушенням або втратою когнітивної функції, наприклад, логічного мислення, здатності до прийняття ситуаційних розв'язків, ємності пам'яті, навченості та/або специфічної навігації. У деяких варіантах реалізації зазначений спосіб включає введення індивіду з одним із вищеописаних захворювань або розладів ефективної кількості антитіла проти тау-білка. В одному з таких варіантів реалізації спосіб додатково включає введення індивіду ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, наприклад, як описано нижче. У деяких варіантах реалізації зазначений спосіб включає введення суб'єкту з одним із захворювань, описаних у даному документі, ефективної кількості антитіла проти тау-білка. В одному з таких варіантів реалізації спосіб додатково включає введення індивіду ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, наприклад, як описано нижче. "Індивід" відповідно до будь-якого з вищеописаних варіантів реалізації може бути людиною.

У додатковому аспекті винаходу запропонований спосіб зниження рівня тау-білка (наприклад, загального тау-білка, загального розчинного тау-білка, розчинного фосфорилованого тау-білка, загального нерозчинного тау-білка, нерозчинного фосфорилованого тау-білка, гіперфосфорилованого тау-білка або парних спіральних філаментів, що містять гіперфосфорилований тау-білок) в індивіда. Наприклад, таке зниження рівня тау-білка можна спостерігати у головному мозку (наприклад, корі головного мозку та/або гіпокампі) або цереброспинальної рідини індивіда. У деяких варіантах реалізації винаходу запропонований спосіб зниження рівня парних спіральних філаментів. У деяких варіантах реалізації зазначений спосіб включає введення індивіду ефективної кількості антитіла проти тау-білка з метою зниження рівня тау-білка. У деяких варіантах реалізації "індивід" є людиною.

У деяких аспектах винаходу запропонований спосіб полегшення одного або більше з симптомів захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком; або антитіло проти тау-білка або лікарський засіб, що містить антитіло проти тау-білка, для полегшення одного або більше з симптомів захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком (наприклад, будь-якого із захворювань або розладів, описаних у даному документі, наприклад, ХА). У деяких аспектах винаходу запропонований спосіб зниження кількості симптомів або тяжкості одного або більше з симптомів захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком; або антитіло проти тау-білка або лікарський засіб, що містить антитіло проти тау-білка, для зниження кількості симптомів або тяжкості одного або більше з симптомів захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком (наприклад, будь-якого із захворювань або розладів, описаних у даному документі, наприклад, ХА). У конкретному варіанті реалізації симптом захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком, являє собою порушення когнітивної функції. У конкретному варіанті реалізації симптом захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком, являє собою порушення навченості та/або пам'яті. У конкретному варіанті реалізації симптом захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком, являє собою втрату довгочасної пам'яті. У конкретному варіанті реалізації симптом захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком, являє собою сплутаність свідомості, подразливість, агресію, емоційну лабільність або порушення мови. У деяких варіантах реалізації симптом захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком, являє собою порушення або втрату однієї або більше з когнітивних функцій, наприклад, логічного мислення, здатності до прийняття ситуаційних розв'язків, ємності пам'яті та/або навченості. Способи, запропоновані у даному документі, включають введення деякої кількості (наприклад, терапевтично ефективної кількості) антитіла проти тау-білка індивіду (наприклад, в якого проявляються один або більше з симптомів захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком).

У конкретних аспектах винаходу запропонований спосіб збереження або збільшення ємності когнітивної пам'яті або вповільнення втрати пам'яті, асоційованої із захворюванням або розладом, асоційованим з тау-білком; або антитіло проти тау-білка або лікарський засіб, що містить антитіло проти тау-білка, для збереження або збільшення ємності когнітивної пам'яті або вповільнення втрати пам'яті, асоційованої із захворюванням або розладом, асоційованим з тау-білком (наприклад, будь-яким із захворювань або розладів, описаних у даному документі, наприклад, ХА). Способи, запропоновані у даному документі, включають введення деякої кількості (наприклад, терапевтично ефективної кількості) антитіла проти тау-білка індивіду (наприклад, в якого проявляються один або більше з симптомів втрати пам'яті або зниження ємності пам'яті).

У деяких аспектах винаходу запропонований спосіб зниження швидкості прогресування захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком; або антитіло проти тау-білка або лікарський засіб, що містить антитіло проти тау-білка, для зниження швидкості прогресування захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком (наприклад, будь-якого із захворювань або розладів, описаних у даному документі, наприклад, ХА). Способи, запропоновані у даному документі, включають введення деякої кількості (наприклад, терапевтично ефективної кількості) антитіла проти тау-білка індивіду (наприклад, в якого проявляються один або більше з симптомів захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком).

У деяких аспектах винаходу запропонований спосіб профілактики розвитку захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком; або антитіло проти тау-білка або лікарський засіб, що містить антитіло проти тау-білка, для профілактики розвитку захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком (наприклад, будь-якого із захворювань або розладів, описаних у даному документі, наприклад, ХА). Способи, запропоновані у даному документі, включають введення деякої кількості (наприклад, терапевтично ефективної кількості) антитіла проти тау-білка індивіду (наприклад, що зазнає ризику захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком).

У деяких аспектах винаходу запропонований спосіб затримки розвитку захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком; або антитіло проти тау-білка або лікарський засіб, що містить антитіло проти тау-білка, для затримки розвитку захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком (наприклад, будь-якого із захворювань або розладів, описаних у даному документі, наприклад, ХА). Способи, запропоновані у даному документі, включають введення деякої кількості (наприклад, терапевтично ефективної кількості) антитіла проти тау-білка індивіду (наприклад, в якого проявляються один або більше з симптомів захворювання або розладу, асоційованого з тау-білком).

У додатковому аспекті даного винаходу запропоновані фармацевтичні склади, які містять будь-яке з антитіл проти тау-білка, запропонованих у даному документі, наприклад, для застосування у будь-якому з вищевказаних терапевтичних способів. У деяких варіантах реалізації фармацевтичний склад містить будь-яке з антитіл проти тау-білка, запропонованих у даному документі, і фармацевтично прийнятний носій. В ще одному варіанті реалізації фармацевтичний склад містить будь-яке з антитіл проти тау-білка, запропонованих у даному документі, і щонайменше один додатковий терапевтичний агент, наприклад, як описано нижче.

Антитіла згідно з даним винаходом можна застосовувати при лікуванні окремо або в комбінації з іншими агентами. Наприклад, антитіло згідно з даним винаходом можна вводити спільно щонайменше з одним додатковим терапевтичним агентом.

Наприклад, композицію відповідно до даного винаходу можна вводити в комбінації з іншими композиціями, що містять додатковий терапевтичний агент, наприклад, біологічно активну речовину або сполуку, наприклад, відому сполуку, яку застосовують при медикаментозному лікуванні таупатій і/або амілоїдозів, групи захворювань та розладів, асоційованих з амілоїдом або амілоїдоподібним білком, наприклад, білком β -амілоїду, залученим у хворобу Альцгеймера.

Як правило, інша біологічно активна сполука може включати підсилювачі переносу сигналу між нейронами, психотерапевтичні лікарські засоби, інгібітори ацетилхолінерастери, блокатори кальцієвих каналів, біогенні аміни, транквілізатори на основі бензодіазепінів, підсилювачі синтезу, накопичення або вивільнення ацетилхоліну, агоністи постсинаптичного рецептора ацетилхоліну, інгібітори моноаміноксидази-А або -В, антагоністи рецептора N-метил-D-аспартатглютамату, нестероїдні протизапальні лікарські засоби, антиоксиданти й антагоністи серотонергічного рецептора або інші терапевтичні агенти. Зокрема, біологічно активний агент або сполука може містити щонайменше одну сполуку, вибрану з антагоністів окисного стресу, антиапоптозних сполук, хелаторів металів, інгібіторів репарації ДНК, наприклад, пірензепіну та його метаболітів, 3-аміно-1-пропансульфонові кислоти (3APS), 1,3-пропандисульфонату (1,3PDS), активаторів секретаз, інгібіторів бета- і гамма-секретаз, тау-білків, антитіл проти тау-

білків (включаючи антитіла, описані у WO2012049570, WO2014028777, WO2014165271, WO2014100600, WO2015200806, US8980270 і US8980271, але не обмежуючись ними), нейромедіатор, руйнівники β -складчастої структури, протизапальні речовини, атипові нейролептики, наприклад, клозапін, зипрасидон, рисперидон, арипіпразол або оланзапін, або інгібітори холінергестери (ChEIs), наприклад, такрин, ривастигмін, донепезил і/або галантамін, і інші лікарські засоби та харчові добавки, наприклад, вітамін B12, цистеїн, попередник ацетилхоліну, лецитин, холін, препарат гінґко, ацетил-L-карнітин, ідебенон, пропентофілін або похідну ксантину, спільно з єднальним пептидом відповідно до даного винаходу, у тому числі з антитілами, зокрема, з моноклональними антитілами та їх активними фрагментами, і, необов'язково, з фармацевтично прийнятним носієм і/або розріджувачем, і/або допоміжною речовиною, а також інструкціями для лікування захворювань.

У деяких варіантах реалізації антитіло згідно з даним винаходом можна вводити в комбінації з неврологічним лікарським засобом. Такі неврологічні лікарські засоби включають антитіло або іншу сполуку, що зв'язується (у тому числі низькомолекулярну сполуку, пептид, аптамер або іншу сполуку, здатну зв'язуватися з білком, але не обмежуючись ними), що специфічно зв'язується з мішенню, вибраною з: бета-секретази, пресеніліну, білка-попередника амілоїду або їх фрагментів, пептиду бета-амілоїду або його олігомерів або фібрил, рецептора загибелі клітин 6 (DR6), рецептора кінцевих продуктів розширеного глікозилювання (RAGE), паркіну та хантингіну; антагоніста рецептора NMDA (тобто мемантину), засобу, що виснажує запаси моноамінів (тобто тетрабеназину); ерголоїду мезилату; протипаркінсонічного антихолінергічного засобу (тобто проциклідину, дифенгідраміну, тригексилфенідилу, бензтропіну, біперидену та тригексифенідилу); протипаркінсонічного дофамінергічного засобу (тобто ентакапону, селегіліну, праміпексолу, бромокриптину, ротиготину, селегіліну, ропініролу, разагіліну, апоморфіну, карбідопи, леводопи, перголіду, толкапону й амантадину); тетрабеназину; протизапального засобу (включаючи нестероїдний протизапальний лікарський засіб (тобто індометацин й інші сполуки, перераховані вище), але не обмежуючись ними; гормону (тобто естрогена, прогестерона та лейпроліду); вітаміну (тобто фолату та нікотинаміду); димеболіну; гомотаурину (тобто 3-амінопропансульфонові кислоти; 3APS); модулятора активності рецептора серотоніну (тобто ксалипродену); інтерферону та глюкокортикоїда або кортикостероїда, але не обмежуються ними. Термін "кортикостероїд" включає флутиказон (включаючи флутиказону пропіонат (FP)), беклометазон, будесонід, циклезонід, мометазон, флунізолід, бетаметазон і триамцинолон, але не обмежується ними. "Інгаляційний кортикостероїд" означає кортикостероїд, який придатний для доставки за допомогою інгаляції. Прикладами інгаляційних кортикостероїдів є флутиказон, беклометазону дипропіонат, буденозид, мометазону фуруат, циклезонід, флунізолід і триамцинолону ацетонід.

У деяких варіантах реалізації з антитілом проти тау-білка, запропонованим у даному документі, можна вводити одне або більше з антитіл проти бета-амілоїду. Необмежуючі приклади таких антитіл до проти бета-амілоїду включають соланезумаб, бапінейзумаб, адуканумаб і BAN-2401 (Biogen, Eisai Co., Ltd.). У деяких варіантах реалізації з антитілом проти тау-білка, запропонованим у даному документі, можна вводити один або більше з інгібіторів агрегації бета-амілоїду. Необмежуючі типові інгібітори агрегації бета-амілоїду включають ELND-005 (також відомий за назвою AZD-103 або сцило-інозит), траміпрокат і PTI-80 (Exebryl-1®; Proteotech). У деяких варіантах реалізації з антитілом проти тау-білка, запропонованим у даному документі, можна вводити один або більше з інгібіторів BACE. Необмежуючі приклади таких інгібіторів BACE включають E-2609 (Biogen, Eisai Co., Ltd.), AZD3293 (також відомий як LY3314814; AstraZeneca, Eli Lilly & Co.), MK-8931 (верубестат) і JNJ-54861911 (Janssen, Shionogi Pharma). У деяких варіантах реалізації з антитілом проти тау-білка, запропонованим у даному документі, можна вводити один або більше з інгібіторів тау-білка. Необмежуючі приклади таких інгібіторів тау-білка включають метилтіоніній, LMTX (також відомий як лейко-метилтіоніній або Trx-0237; TauRx Therapeutics Ltd.), Rember™ (метиленовий синій або метилтіоніній хлорид [MTC]; Trx-0014; TauRx Therapeutics Ltd), PBT2 (Prana Biotechnology) і PTI-51-CN3 (TauPro™; ProteoTech). У деяких варіантах реалізації з антитілом проти тау-білка, запропонованим у даному документі, можна вводити одне або більше з інших антитіл проти тау-білка. Необмежуючі приклади таких інших антитіл проти тау-білка включають BMS-986168 (Bristol-Myers Squibb) і C2N-8E12 (AbbVie, C2N Diagnostics, LLC). У деяких варіантах реалізації з антитілом проти тау-білка, запропонованим у даному документі, можна вводити інгібітор загального неправильного фолдинга, наприклад, NPT088 (NeuroPhage Pharmaceuticals).

У деяких варіантах реалізації композиція відповідно до даного винаходу може містити ніацин або мемантин разом з химерним антитілом або гуманізованим антитілом відповідно до даного винаходу, у тому числі з антитілами, зокрема, з моноклональними антитілами та їх активними

фрагментами, і, необов'язково, з фармацевтично прийнятним носієм і/або розріджувачем, і/або допоміжною речовиною.

У деяких варіантах реалізації запропоновані композиції, які містять "атипові нейролептики", наприклад, клозапін, зипрасидон, рисперидон, арипіпразол або оланзапін для лікування позитивних і негативних психотичних симптомів, у тому числі галюцинацій, марення, розладів мислення (що проявляються у вираженій непогодженості дій, порушенні планів, тангенціальності мислення), й ексцентричної або неорганізованої поведінки, а також ангедонії, притупленого афекту, апатії та соціального відчуження, разом з химерним антитілом або гуманізованим антитілом відповідно до даного винаходу або його активних фрагментів, і, необов'язково, з фармацевтично прийнятним носієм і/або розріджувачем, і/або допоміжною речовиною.

Іншими сполуками, які можна належним чином застосовувати в композиціях на додаток до химерного антитіла або гуманізованого антитіла відповідно до даного винаходу, є сполуки, які описані, наприклад, у заявці WO 2004/058258 (див., насамперед, сторінки 16 і 17), у тому числі мішені терапевтичних лікарських засобів (сторінки 36-39), алкансульфонові кислоти й алкансерні кислоти (сторінки 39-51), інгібітори холінестерази (сторінки 51-56), антагоністи рецептора NMDA (сторінки 56-58), естрогени (сторінки 58-59), нестероїдні протизапальні лікарські засоби (сторінки 60-61), антиоксиданти (сторінки 61-62), агоністи рецепторів, що активуються пероксисомальними проліфераторами (PPAR) (сторінки 63-67), агенти, що знижують рівень холестерину (сторінки 68-75); інгібітори амілоїду (сторінки 75-77), інгібітори утворення амілоїду (сторінки 77-78), хелатори металів (сторінки 78-79), нейролептики й антидепресанти (сторінки 80-82), харчові добавки (сторінки 83-89) і сполуки, що підвищують доступність біологічно активних речовин у головному мозку (дивися сторінки 89-93) і пролікарські препарати (сторінки 93 і 94); зазначений документ включений у даний опис за допомогою посилання, особливо сполуки, згадані на вищевказаних сторінках.

Такі комбіновані терапевтичні засоби, відзначені вище, охоплюють комбіноване введення (при включенні двох або більше терапевтичних агентів в один і той самий або окремі склади), а також роздільне введення; в останньому випадку введення антитіла згідно з даним винаходом може відбуватися до, одночасно та/або після введення додаткового терапевтичного агента або агентів. У деяких варіантах реалізації введення антитіла проти тау-білка та введення додаткового терапевтичного агента відбувається з інтервалом приблизно один місяць, або приблизно один, два або три тижні, або приблизно один, два, три, чотири, п'ять або шість днів.

Антитіло згідно з даним винаходом (і будь-який додатковий терапевтичний засіб) можна вводити будь-яким підходящим способом, що включає парентеральне, внутрішньолегеневе, інтраназальне введення та, при необхідності місцевого лікування, введення у вогнище захворювання. Парентеральні вливання включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревинне або підшкірне введення. Введення дози можна здійснювати будь-яким підходящим способом, наприклад, за допомогою ін'єкцій, наприклад, внутрішньовенних або підшкірних ін'єкцій, частково залежно від того, чи є введення коротким або хронічним. У даному документі розглянуті різні схеми застосування, включаючи одне- або багаторазові введення в різні моменти часу, болюсне введення й імпульсну ін'єкцію, але не обмежуючись ними.

Антитіла згідно з винаходом слід складати, дозувати і вводити відповідно до належної медичної практики. Фактори, які слід ураховувати у даному контексті, включають конкретний розлад, що підлягає лікуванню, конкретний ссавець, що зазнає лікування, клінічний стан окремо взятого пацієнта, причину розладу, область доставки агента, спосіб введення, схему введення та інші фактори, відомі практикуючим лікарям. Комбінування антитіла з одним або більше агентами, які застосовують у даний час для профілактики або лікування розглянутого порушення, є необов'язковим, але можливим. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості антитіла, що присутній в складі, виду розладу або лікування, й інших факторів, що обговорювалися вище. Як правило, інші агенти застосовують у тих самих дозах і за допомогою того самого шляху введення, як описано у даному документі, або в дозах, що становлять від приблизно 1 до 99 % дозувань, описаних у даному документі, або у будь-якій дозі та за допомогою будь-якого шляху введення, емпірично/клінічно вважаються придатними.

Доза антитіла згідно з винаходом, придатна для профілактики або лікування захворювання (при застосуванні в якості монотерапії або в комбінації з одним або більше додатковими терапевтичними агентами), залежить від типу захворювання, що підлягає лікуванню, типу антитіла, тяжкості та протікання захворювання, введення антитіла у профілактичних або терапевтичних цілях, попередньої терапії, історії хвороби пацієнта та його реакції на антитіло, і розсуду лікаря. Антитіло придатне для введення пацієнту однократно або у декілька приймать.

Залежно від виду та тяжкості захворювання, первісне передбачуване дозування антитіла для введення пацієнту, наприклад, за допомогою одного або більше роздільних введень або безперервного впливання, становить від приблизно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1 мг/кг - 10 мг/кг). Типова щоденна доза може знаходитися в діапазоні від приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше залежно від вищезгаданих факторів. При повторному введенні протягом декількох днів або довше, залежно від стану, лікування зазвичай слід продовжувати до бажаного придушення симптомів захворювання. Одна типова доза антитіла повинна становити від приблизно 0,05 мг/кг до приблизно 10 мг/кг. Так, пацієнту можна ввести одну або більше з доз, що становлять приблизно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг або 10 мг/кг (або будь-яку їхню комбінацію). Такі дози можна вводити з перервами, наприклад, щотижня або кожні три тижні (наприклад, таким чином, що пацієнт одержує від приблизно двох до приблизно двадцяти, або, наприклад, приблизно шість доз антитіла). Можна вводити початкову підвищену навантажувальну дозу, а потім - одну або більше знижені дози. У той самий час можна застосовувати інші схеми лікування. Хід лікування можна контролювати за допомогою звичайних методик й аналізів.

Слід розуміти, що будь-який з вищевказаних складів або терапевтичних способів можна реалізувати із застосуванням імунокон'югату згідно з даним винаходом замість або на додаток до антитіла проти тау-білка.

Н. Вироби

В ще одному аспекті винаходу запропонований виріб, що містить матеріали, придатні для лікування, профілактики і/або діагностики розладів, описаних вище. Виріб включає контейнер й етикетку або вкладиш в упакування, вкладений або пов'язаний з контейнером. Підходящі контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци, пакети з розчинами для внутрішньовенного введення та т. п.

Контейнери можуть бути виготовлені з різних матеріалів, наприклад, скла або пластмаси. Контейнер містить композицію, яку ефективно застосовують при лікуванні, профілактиці та/або діагностиці патологічного стану окремо або в комбінації з іншою композицією, і може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, контейнер може являти собою пакет з розчином для внутрішньовенного введення або флакон з пробкою, що проколюється голкою для підшкірної ін'єкції). Щонайменше один активний агент у композиції є антитілом згідно з даним винаходом. На етикетці або на вкладиші в упакування зазначено, що композиція використовується для лікування вибраного патологічного стану. Крім того, виріб може містити (а) перший контейнер з композицією, що міститься в ньому, причому композиція містить антитіло згідно з даним винаходом; і (b) другий контейнер з композицією, що міститься в ньому, причому композиція включає додатковий цитотоксичний або інший терапевтичний засіб. У даному варіанті реалізації винаходу виріб може додатково містити вкладиш в упакування, в якому зазначено, що композиції можна застосовувати для лікування конкретного патологічного стану. В якості альтернативи або доповнення, виріб може додатково містити другий (або третій) контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, наприклад, бактеріостатичну воду для ін'єкцій (BWF), фізіологічний розчин з фосфатним буфером, розчин Рінгера та розчин декстрази. Він може додатково містити інші матеріали, бажані з комерційної та споживчої точки зору, у тому числі інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

Слід розуміти, що будь-який із зазначених вище виробів може містити імунокон'югат згідно з даним винаходом замість антитіла проти тау-білка або на додаток до нього.

III. ПРИКЛАДИ

Нижче наведені приклади способів і композицій згідно з даним винаходом. Слід розуміти, що враховуючи загальний опис, представлений вище, можна здійснити різні інші варіанти реалізації даного винаходу.

Приклад 1: Одержання тау-білка для імунізації

Одержання мономерного рекомбінантного тау-білка

Рекомбінантний конструктор ізоформи 2N4R тау-білка людини (амінокислоти 2-441) об'єднали з N-кінцевим His-маркером для полегшення очищення й оцінки характеристик. Див., наприклад, Фігуру 15. Гібридний конструктор клонували у векторі pET52b (Novagen) й експресували в *E. coli*. Клітини збирали і лізували в денатуруючих умовах з використанням 7 М хлориду гуанідинію протягом ночі при 4 °C і перемішуванні. Залишки клітин осаджували при 40000 об./хв. протягом 1 години. Рекомбінантний білок з His-маркером виділяли за допомогою нікель-афінної хроматографії (афінна смола Ni-Sepharose excel, GE Healthcare Life Sciences) з наступною ексклюзійною хроматографією (смола Superdex 200, GE Healthcare Life Sciences) при денатуруючих умовах. Хлорид гуанідинію видаляли діалізом виділеного білка в 20 mM MES, 50 mM NaCl і 1 mM TCEP при pH 6,8. Потім видаляли His-маркер за допомогою протеази TEV, після

чого виконували остаточне очищення за допомогою катіоннообмінної хроматографії (колонка Mono S, GE Healthcare Life Sciences) з метою видалення відщепленого His-маркера. Буфер для очищення містив 0,1 % тритон x-114 (об./об.) для видалення ендотоксинів. Очищений протеїн діалізували у PBS з 1 мМ ТСЕР. Чистоту та мономірність аналізували за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ і SEC-MALLS. Ідентичність підтверджували мас-спектрометрією. Концентрацію білка визначали за УФ-поглинанням при довжині хвилі 280 нм. Кінцевий продукт не містив ендотоксинів (< 0,5 ЕЕ/мл), згідно з кінетичним аналізом з лізатом амебоцитів *Limulus* (LAL).

Одержання фосфоризованого тау-білка

Фосфорилований тау-білок одержали з використанням конструкта 2-441 тау-білка, отриманого з використанням способу, описаного вище. Білковий конструкт фосфорилували за допомогою 0,5 мМ кінази PKA (Life Technologies), що фосфорилує, серед інших залишків, серин-409. Реакційну суміш інкубували з 1 мМ АТФ, 5 мМ $MgCl_2$ при кімнатній температурі протягом 72 годин. Фосфорилування підтверджували мас-спектрометрією. Для видалення кінази використовували ексклюзійну хроматографію (Superdex 75, GE Healthcare Life Sciences). Чистоту, мономірність та рівень ендотоксинів у препараті фосфорилованого білка аналізували в основному відповідно до вищенаведеного опису. Олігомеризація мономерного тау-білка *in vitro*

Олігомерний тау-білок одержали з використанням конструкта 2-441 мономерного тау-білка. Мономерний білок спочатку діалізували в 20 мМ N,N-біс-(2-гідроксietил)-2-аміноетансульфонову кислоту (BES), 25 мМ NaCl, pH 7,4, з наступною олігомеризацією з використанням 75 мМ арахідонової кислоти (Cayman Chemicals) і 18 кДа гепарину (Sigma Aldrich) в еквімолярній концентрації з білком при 37 °C протягом 3 діб. Олігомеризацію підтверджували аналізом флуоресценції з тіофлавіном Т, динамічним світлорозсіюванням (DLS) й аналітичною ексклюзійною хроматографією. Олігомерний тау-білок у деяких випадках називали "оліго-тау-білком".

Приклад 2:

Одержання антитіл проти тау-білка

Способи

Одержання гібридом

Самок мишей C57BL/6JOlaHsd (C57BL/6) і BALB/c OlaHsd (Balb/c) дикого типу (Harlan, США) одержали у віці 9 тижнів. Мишей з нокаутом гена тау-білка (B6.129-maptm1Hnd/J; The Jackson Laboratory, США) одержали у віці 6 і 9 тижнів. Вакцинацію почали у віці 12-15 тижнів. Мишей вакцинували олігомеризованим тау-білком людини. Перед вакцинацією оліго-тау-білок змішували з одним із двох ад'ювантів, використаних у даному дослідженні: системою ад'ювантів Ribi Adjuvant System (Ribi; Sigma-Aldrich, Швейцарія) у концентрації 50 % (об./об.), або комбінацією одноланцюгових синтетичних ДНК-олігодезоксинуклеотидів CpG (CpG; Microsynth, Швейцарія) і гідроксиду алюмінію (Al; Brenntag, Швейцарія). Ад'ювант Ribi являв собою 2 % емульсію сквалена типу "масло у воді", що містить монофосфорилліпід А (виділений з *Salmonella minnesota*) і синтетичний трегалозодикариноміколат (виділений з фактора джгутикоутворення туберкульозної палички) у скваленовому маслі, 0,2 % Tween-80 і воду.

Мишей вакцинували шляхом підшкірної (п/ш) ін'єкції, за винятком груп D і G, які одержали комбінацію внутрішньоочеревинного (в/ч) введення та введення в область скакального суглоба. Мишам у групі D вводили 50 мкг оліго-тау-білка в/ч і 10 мкг оліго-тау-білка в область скакального суглоба. Мишам у групі G вводили 8 мкг оліго-тау-білка в/ч і 2 мкг оліго-тау-білка в область скакального суглоба. Див. таблицю 2.

Для вакцинації із застосуванням CpG і Al (CpG/Al) в якості ад'юванта кожна 200-мкл ін'єкція містила 60 мкл (30 нмоль) CpG, 1 мг Al і 50 мкг оліго-тау-білка. Мишам усіх досліджуваних груп виконували ін'єкції в 0, 14, 35 і 56 добу. Мишей, використаних для злиття з мієломними клітинами (Nanotools, Німеччина), додатково вакцинували трьома щоденними вторинними ін'єкціями оліго-тау-білка (50 мкг на в/ч ін'єкцію) без додавання ад'юванта.

Таблиця 2

Миші та протоколи вакцинації

Досліджувана група	Лінія мишей	Загальна доза оліго-тау-білка (мкг/ін'єкцію)	Ад'ювант	Шлях вакцинації
A	C57BL/6	50	CpG/Al	п/ш
B	C57BL/6	50	Ribi	п/ш
C	Balb/c	50	CpG/Al	п/ш
D	Balb/c	60	CpG/Al	область скакального суглоба + в/ч
E	Balb/c	5	Cpg/Al	п/ш
F	Balb/c	50	Ribi	п/ш
G	Нокаут гена тау-білка	10	Ribi	область скакального суглоба + в/ч

Мишей знекровлювали й умертвляли через день після останньої з трьох вторинних ін'єкцій, спленоцити зливали з мієломними клітинами, одержуючи гібридами, які продукують антитіла.

5 Вибір гібридом для субююнування

Для злиття клітин мишей розділили на три групи, виконавши у цілому 10 експериментів зі злиття (2 в одній групі, чотири в другій групі та чотири - у третій групі) й одержавши 299 гібридом. Життєздатні гібридом культивували в селективному середовищі із сироваткою, кращі гібридом селектували для субклонування, застосовуючи твердофазний ІФА для виявлення зв'язування повнорозмірного тау-білка людини й оліго-тау-білка, як описано нижче. Після обмежуючого розведення остаточно гібридом культивували у безсироватковому середовищі; середовище стабільних колоній збирали для скринінгу та відбору антитіл. Скринінговий твердофазний ІФА

10 Виконували збір безсироваткової надосадової рідини стабільних гібридом. Надосадову рідину, яка містить антитіла, що представляють інтерес, піддавали скринінгу із застосуванням твердофазного ІФА з метою дослідження властивостей антитіл і відбору антитіл для подальшої розробки. Твердофазний ІФА використовували для визначення наступних властивостей: зв'язування з повнорозмірним тау-білком людини (flTau; Signalchem, Канада), зв'язування з гіперфосфорилованим flTau (Genentech, США), порівняння зв'язування з олігомерним і мономерним препаратами flTau та зв'язування з епітопом(ами) тау-білка для деяких антитіл. Коротенько, 96-ямкові планшети MaxiSorp для твердофазного ІФА (Nunc, Данія) покривали однією з мішеней, зазначених у таблиці 3.

Таблиця 3

Мішені, які використані для скринінгового твердофазного ІФА.

Аналіз	Схема твердофазного ІФА	Мішень
Зв'язування з flTau	Прямий твердофазний ІФА	Повнорозмірний тау-білок людини (flTau), іммобілізований у концентрації 1 мкг/мл
Зв'язування з pTau	Прямий твердофазний ІФА	Повнорозмірний тау-білок людини, фосфорилований in vitro з використанням 4 кіназ (GSK3 β , Cdk5, PKA та CK1 δ ; гіперфосфорилований тау-білок, або pTau), очищений та іммобілізований у концентрації 1 мкг/мл
Картування епітопу	Прямий твердофазний ІФА	Біотинільовані 15-членні пептиди, що перекривають область з 441 амінокислоти (АК) тау-білка людини зі зрушенням 9 АК і перекриванням 6 АК, іммобілізовані в концентрації 10 мкг/мл на 96-ямковий планшет зі стрептавідином
Зв'язування з	Твердофазний	Біотинільований олігомерний та мономерний flTau з AVI-

оліго-тау-білком	ІФА із захопленням	маркером, захоплюваний у розчині тестованими іммобілізованими антитілами проти IgG
------------------	--------------------	--

Іммобілізацію виконували протягом ночі у фізіологічному розчині з фосфатним буфером (PBS) при 4 °С. Планшети ретельно промивали 0,05 % Tween-20/PBS і блокували 1 % бичачим сироватковим альбуміном (БСА) в 0,05 % Tween-20/PBS протягом 1 год. при 37 °С. Антитіло, що міститься в надосадовій рідині гібридом, додавали до зазначених розведень й інкубували протягом 2 год. при 37 °С, після чого планшети промивали, як описано раніше.

Для прямого твердофазного ІФА додавали вторинні антитіла проти IgG миші, кон'юговані зі ЩФ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Великобританія), при розведенні 1/6000 в 0,05 % Tween-20/PBS на 2 год. при 37 °С. Після останнього промивання планшети інкубували з розчином гексагідрату р-нітрофенілфосфату динатрія (pNPP; Sigma-Aldrich, Швейцарія) (субстрату фосфатази) і зчитували при 405 нм з використанням планшет-рідера для твердофазного ІФА (Тесап, Швейцарія). Результати виражали в одиницях оптичної щільності (O.D.).

Для твердофазного ІФА із захопленням оліго- і моно-тау-білка антитіла, що містилися у безсироватковій стерильній надосадовій рідині гібридом, іммобілізували на планшетах з іммобілізованим антитілом проти IgG при 500-кратному розведенні, а потім інкубували з оліго- або моно-тау-білком, сайт-специфічно біотинільованим через AVI-маркер. Інкубування мішені почали при концентрації 5 мкг/мл, а потім розбавили у 8 або 16 разів. Для кількісної оцінки сигналу на планшет-рідері (Тесап, Швейцарія) використовували стрептавідин-ПХ і субстрат ABTS. Результати виражали в одиницях оптичної щільності (O.D.).

Оцінки спорідненості

Спорідненість неочищених антитіл у безсироватковій надосадовій рідині гібридом оцінювали за допомогою поверхневого плазмонного резонансу з використанням приладу Віасоге Т-100 (GE Healthcare, Великобританія). Антитіла іммобілізували на чип біосенсора з антитілами проти IgG і використовували f1Tau (Signalchem, Канада) в якості аналізованої речовини-мішені. Аналіз кінетики виконували з використанням моделі Ленгмюра 1:1.

Аналіз на основі електрофорезу в ДСН-ПААГ і вестерн-блоттингу

Зв'язування відібраних антитіл проти будь-яких форм тау-білка з тау-білком у головному мозку людини аналізували шляхом вестерн-блоттингу (WB), використовуючи лізати головного мозку трьох донорів із ХА та трьох контрольних донорів відповідного віку без ХА (Tissue Solutions, Великобританія). Лізати обробили, одержавши розчинну фракцію тау-білка, що не містила детергенту. Оброблені лізати завантажили в гелі з 4-12 % біс-трисом (Novex, Life Technologies, Швейцарія), перенесли на ПВДФ-мембрани Immobilon і виконали блоттинг із тестованими антитілами і з вторинним антитілом кози IRDye 800CW проти антитіл миші (Li-Cor, США).

Твердофазний ІФА з використанням лізатів головного мозку людини

Для оцінки зв'язування вибраних антитіл з неденатурованим тау-білком людини в лізатах головного мозку при ХА та контрольних лізатах головного мозку антитіла з надосадової рідини гібридом, а також негативні та позитивні контрольні антитіла іммобілізували на 96-ячковому планшеті, як описано вище. Потім виконували захоплення та виявлення тау-білка в розчинних лізатах головного мозку людини від суб'єктів при ХА або контрольних суб'єктів відповідного віку (400 мкг/мл білка, всі зразки отримані з Tissue Solutions, Великобританія) з використанням поліклонального антитіла кролика проти будь-яких форм тау-білка (Abeam, Великобританія), а потім - кон'югату "антитіло проти Fc-γ-фрагмента IgG кролика-ЩФ" (Jackson ImmunoResearch, США). Лізати головного мозку миші з нокаутом гена тау-білка використовували в якості негативного контрольного зразка. Планшети інкубували з розчином субстрату фосфатази pNPP (Sigma-Aldrich) і зчитували при довжині хвилі 405 нм з використанням планшет-рідера для твердофазного ІФА (Тесап, Швейцарія). Результати виражали в одиницях оптичної щільності (O.D.).

Секвенування антитіл гібридом

Лізати клітин гібридом відправили в Antitope (Antitope, Великобританія) для секвенування генів варіабельної області. Коротенько, ЗТ-ПЛР проводили з використанням пулів вироджених праймерів для сигнальних послідовностей миші разом із праймерами константної області для кожного гена варіабельної області важкого ланцюга (VH) IgG, VH IgM, варіабельної області легкого каппа- (KVL) і λ-VL ланцюгів Ig. мРНК V-області важкого ланцюга ампліфікували з використанням набору з шести пулів вироджених праймерів (HA-HF), специфічних стосовно сигнальних послідовностей VH, разом з IgM або IgG-специфічними праймерами константної області. мРНК V-області легкого ланцюга ампліфікували з використанням набору з восьми пулів

вироджених праймерів, специфічних стосовно сигнальних послідовностей, сім з яких були специфічні стосовно каппа-кластера (KA-KG) й один - до λ -кластера (LA), разом з праймерами константної області k- або λ , -ланцюга. ПЛР-продукти, отримані в результаті успішної ампліфікації, очищали, клонували в клонуючому векторі "TA" (pGEM-T Easy, Promega), трансформованому в *E. coli*, і секвенували окремі колонії. Нуклеотидні й амінокислотні послідовності VH- і VL-областей антитіл визначили у послідовностях 27 гібридом, які продукують антитіла.

Результати

Вибір гібридом для субклонування

Гібридами, отримані в кожному з трьох циклів злиття (у цілому 299 гібридом, отриманих з десяти злиттів), спочатку аналізували на предмет зв'язування з flTau, причому відібрані гібридами додатково аналізували на предмет зв'язування з рTau й олігомеризованим тау-білком. Мета дослідження полягала у відборі антитіл, рівною мірою добре зв'язуючих тау-білок і тау-білок з посттрансляційними модифікаціями, наприклад, фосфорилований або олігомерний тау-білок. Для цього гібридами аналізували з метою відбору кращих властивостей стосовно будь-яких форм тау-білка. Для визначення області зв'язування антитіла та конкретного епітопу тау-білка спочатку визначали область зв'язування з використанням різних фрагментів тау-білка, а потім - бібліотеки 15-членних пептидів тау-білка, що перекриваються, які охоплюють повну послідовність самої довгої ізоформи тау-білка людини, що містить 441 амінокислоту (AK). Групу антитіл, що зв'язуються із заздалегідь певними областями тау-білка, навмисно виключили з експерименту з метою максимізації зв'язування з різними формами тау-білка, що містять посттрансляційні модифікації, і всіма шістьма різними ізоформами тау-білка людини, що присутні в людей.

Три серії злиття дозволили одержати 133 субклонованих стабільних гібридом, які піддали скринінгу для виявлення кращих властивостей стосовно будь-яких форм тау-білка. Комбінацію різних скринінгових аналізів використовували для зниження кількості гібридом, які продукують антитіла, що мають властивості, переважні для антитіл проти будь-яких форм тау-білка. Для порівняння зв'язування з flTau та рTau проаналізували 90 гібридом і відібрали 24 гібридами, показані на Фігурі 1A-F. Оскільки початковий скринінг виконували з використанням фрагментів тау-білка з метою уникнути відбору антитіл, що зв'язуються з областями тау-білка, які свідомо характеризуються високою щільністю залишків, що зазнають фосфорилювання при хворобі Альцгеймера (ХА) та інших таупатіях, більшість протестованих антитіл зв'язувалися як з flTau, так і з рTau з аналогічними властивостями зв'язування, відповідно до даного твердофазного ІФА.

У деяких варіантах реалізації бажано, щоб антитіло проти будь-яких форм тау-білка зв'язувало мономерні й олігомерні форми тау-білка без явної переваги стосовно якого-небудь з них. Схему твердофазного ІФА із захопленням розробили з метою визначення зв'язування антитіл як з мономерними, так і з олігомерними формами flTau. Твердофазний ІФА в режимі захоплення зберігав олігомерну конформацію заздалегідь олігомеризованого тау-білка та мономерний стан моно-тау-білка краще, ніж у режимі прямого твердофазного ІФА з іммобілізацією мішеней на планшеті для твердофазного ІФА.

Виконали кожний варіант аналізу, безпосередньо порівнюючи зв'язування двох форм тау-білка з усіма 90 тестованими антитілами. Антитіла, які свідомо характеризуються переважним зв'язуванням з оліго-тау-білком або не розрізняють зазначені дві форми тау-білка, використовували в якості контрольних антитіл при кожному варіанті аналізу. Результати для 18 гібридом показані на Фігурі 2A-E.

Картування епітопів має важливе значення для відбору антитіл з гарними властивостями стосовно будь-яких форм тау-білка, оскільки дозволяє виключити антитіла, що зв'язуються з областями з високою щільністю потенційних залишків рTau (Ser, Thr і Tyr). Зв'язування з усіма шістьма ізоформами тау-білка людини також використовували в якості критерію відбору антитіл проти будь-яких форм тау-білка. Епітопи, що забезпечують зв'язування спочатку відібраних антитіл з будь-якими формами тау-білка, перевіряли і визначали з підвищеною точністю, використовуючи бібліотеку з 49 пептидів, довжина кожного з яких становила 15 амінокислот (AK), що охоплюють повнорозмірний тау-білок людини з перекриттям 6 АК залишків і зсувом 9 АК. Нумерація залишків була заснована на найдовшій ізоформі тау-білка людини (441 АК). Неочищені антитіла використовували при високому розведенні (1/10) для перевірки зв'язування або відсутності зв'язування з усіма пептидами. Скринінг антитіл 112 гібридом, раніше відібраних за допомогою твердофазного ІФА, продемонстрував зв'язування з 20 різними епітопами тау-білка (таблиця 4).

Епітопи тау-білка для антитіл

Антитіло	Епітоп тау-білка (AK)
14F5-D9	1-15
94B2-B12	1-15
94B2-C1	1-15
10A1-A6	10-24
10A1-D8	10-24
11E10-B8	10-24
17G12-C11	10-24
17G12-D5	10-24
19H6-A1	10-24
19H6-F7	10-24
19H6-G8	10-24
30A1-C9	73-87
30A1-D11	73-87
28F5-G8	82-96
28F5-H8	82-96
33G9-A11	100-114
33G9-B9	100-114
52F2-E12	100-114
52F2-E8	100-114
52F6-B3	100-114
52F6-F11	100-114
56D3-C8	100-114
37D3-H12	10-24
37D3-H9	10-24
37E8-B4	10-24
37E8-C2	10-24
3A4-H4	10-24
3H10-E12(A)	10-24
3H10-G12	10-24
44B7-A9	10-24
44B7-B1	10-24
54C1-H11	10-24
61E7-B11	10-24
61H10-B4	10-24
61H10-H3	10-24
127G7-A5	10-24
127G7-E7	10-24
115A4-A3	10-24
115A4-B1	10-24
125B11-B6	10-24
73C8-A5	10-24
73C8-G4	10-24
76B4-D9	10-24
76B4-H7	10-24
123E9-B3	19-33
15C6-A7	19-33
19F8-B1	19-33
24A11-D5	19-33
63H3-B2	19-33
63H3-D8	19-33
64B9-E11	19-33
64B9-F12	19-33
45D2-C9	19-33

Епітопи тау-білка для антитіл

Антитіло	Епітоп тау-білка (AK)
45D2-F4	19-33
72E12-B2	19-33
72G10-A7	19-33
72G10-B6	19-33
123E9-A1	19-42
19F8-C11	19-42
7A11-C12	19-42
89F4-A2	28-42
89F4-A1	28-44
12A10-E8	37-51
55E7-B12	37-51
72E12-H9	37-51
55E7-F11	37-51
30D12-B5	64-78
21C1-D8	64-78
56D3-E9	100-114
70B10-B6B2	100-114
70B10-B6G12	100-114
78E4-D11	100-114
78E4-G4	100-114
30G1-B2	109-123
30G1-C11	109-123
49G10-F4	109-123
49G10-H1	109-123
65B1-A2	109-123
65B1-A7	109-123
73H6-B8	109-123
113F5-A8	109-123
113F5-F7	109-123
125B11-H3	109-123
26C1-B11	118-132
26C1-C8	118-132
74H10-A3	118-132
74H10-C3	118-132
78F3-B2	118-132
78F3-E7C6	118-132
78F3-E7H7	118-132
126H12-G6	136-150
126H12-H7	136-150
22G7-C9	154-168
22G7-G9	154-168
111B8-C4	163-177
111B8-F10	163-177
66F5-A1	172-177
66F5-F2	172-177
71H8-A1	190-204
71H8-D6	190-204
83E10-D10	190-204
83E10-D6	190-204
126F11-B3	217-231
126F11-G11	217-231
93A8-C9	397-411
93A8-D2	397-411

Таблиця 4

Епітопи тау-білка для антитіл

Антитіло	Епітоп тау-білка (AK)
21C1-G6	64-78
30D12-F6	64-78
31A3-A4	64-78
31A3-A7	64-78
77D1-D2	64-78
77D1-E6	64-78

- 5 Вимірювання спорідненості до f1Tau виконали для 46 антитіл за допомогою ППР на приладі Biacore з визначенням K_D . Вимірювання спорідненості на Biacore виконували шляхом іммобілізації антитіл на чипі з антитілами проти IgG і використовуючи f1Tau в якості цільової аналізованої сполуки. Результати для 32 антитіл наведені в таблиці 5, причому антитіла відсортовані за спорідненістю до f1Tau. Серед досліджених на предмет спорідненості до f1Tau антитіл 22 антитіла мали спорідненість краще 20 нМ, з них 14 антитіл мали K_D нижче 5 нМ, а антитіло 37D3-H9 мало K_D (спорідненість), рівну 1 нМ.

Таблиця 5

Спорідненість до f1Tau

Антитіло	K_D (нМ)
37D3-H9	1
54C1-H11	1,5
123E9-A1	1,8
94B2-C1	1,9
24A11-D5	2
113F5-F7	2,4
89F4-A1	2,9
19F8-B1	2,9
61E7-C4	3,3
126F11-G11	4,2
26C1-C8	4,3
93A8-D2	4,3
37E8-B4	4,4
61E7-B11	4,8
125B11-H3	6
54C1-C3	6,8
3A4-H4	7,8
52F6-F11	8,4
3A4-A12	10,1
44B7-B1	14,7
3H10-E12	19,4
10A1-D8	19,6
52F2-E8	26
19H6-F7	39
34H4-F5	43
19H6-A1	56
34H4-B10	69
17G12-C11	118
45H12-C4	139
17G12-D5	161
61H10-H3	177
11E10-C3	399

Для перевірки зв'язування вибраних антитіл до всіх шести ізоформ тау-білка людини виконали електрофорез у ДСН-ПААГ з леддером на основі рекомбінантного тау-білка, що містить всі шість ізоформ, і вестерн-блоттинг (WB) з використанням трьох вибраних антитіл проти тау-білка. Всі три антитіла проти будь-яких форм тау-білка зв'язували всі шість ізоформ тау-білка (Фігура 3). Крім того, гомогенати головного мозку трьох суб'єктів з ХА та двох контрольних суб'єктів відповідного віку одночасно аналізували з метою порівняння. Як і очікувалося на основі картованих епітопів, усі три антитіла, протестовані в даному аналізі, продемонстрували зв'язування з усіма шістьма ізоформами тау-білка. Відмінність, що спостерігалася в картині смуг у суб'єктів-людей з ХА та контрольних донорів, може відображати більший ступінь фосфорилування та/або ДСН-стабільні агрегати тау-білка, які, як очікується, повинні бути присутніми у суб'єктів з ХА.

Зразки від людей з хворобою Альцгеймера (ХА) та контрольні зразки додатково аналізували за допомогою твердофазного ІФА із захопленням у не денатуруючих умовах з метою перевірки зв'язування з тау-білком у головному мозку людей. Зразки лізатів двох суб'єктів з ХА та двох контрольних суб'єктів відповідного віку без ХА, оброблені для виділення розчинного тау-білка, аналізували в 8 розведеннях, тестуючи три антитіла (Фігура 4А-С).

Послідовності варіабельного ланцюга антитіла визначили для 27 гібридом (Antitope, Великобританія). Білкові послідовності деяких варіабельних доменів і гіперваріабельних областей (HVR) важких і легких ланцюгів показані в таблиці послідовностей.

Приклад 3: Дослідження характеристик антитіл проти тау-білка

Важкі та легкі ланцюги антитіла конструювали за допомогою синтезу генів і субклонування отриманої ДНК в експресійних векторах ссавців для IgG2a миші (важкий ланцюг) та каппа-ланцюга (легкого ланцюга) миші. Антитіла експресували в клітинах CHO або 293Т шляхом часової спільної трансфекції плазмід для важкого ланцюга та легкого ланцюга й очищали з використанням афінної смоли Mabselectsure (GE Healthcare Life Sciences). Очищені рекомбінантні антитіла піддавали скринінгу на предмет зв'язування з мономерним тау-білком на приладі Biacore T200 для поверхневого плазмонного резонансу з використанням набору для захоплення IgG миші та чипа Series S CM5. Антитіла у форматі mIgG2a, розведені 10 мМ HEPES pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween 20 (буфером для аналізу, HBSP) захоплювали протягом 30 або 45 секунд у концентрації 1 мкг/мл (антитіла 26C1, 94B2-C1, 52F6-F11.v1, 52F6-F11.v2, 11E10-B8, 55E7-F11, 125B11-H3, 123E9-A1, 30G1-B2, 66F5-A1, 89F4-A1, 93A8-D2 і 126F11-G11) або протягом 70 або 150 секунд у концентрації 0,1 мкг/мл (антитіла 19H6-F7, 3A4-H4, 54C1-H11 і 37D3-H9) при швидкості потоку 10 мкл/хв. Зв'язування мономера тау-білка в HBSP відслідковували при 25 °C, швидкості потоку 30 мкл/хв. і концентраціях 16, 31, 63, 125, 125, 250 і 500 нМ для антитіл 26C1 і 94B2; 16, 31, 63, 125, 125, 250, 500 і 1000 нМ для антитіл 52F6-F11.v1 і 52F6-F11.v2; 6, 19, 56, 56, 167 і 500 нМ для антитіл 11E10-B8, 55E7-F11 і 125B11-H3; 5, 16, 49, 148, 444, 1333 і 4000 нМ для антитіл 123E9-A1, 30G1-B2, 66F5-A1, 89F4-A1, 93A8-D2 і 126F11-G11; 0,4, 1,6, 6,3, 2,5, 100 і 400 нМ для 19H6-F7; і 0,2, 0,8, 4, 4, 20 і 100 нМ для 3A4-H4, 54C1-H11 і 37D3-H9. Час асоціації та дисоціації відслідковували протягом 180-480 секунд і 300-600 секунд, відповідно. Антитіло 37D3-H9 відібрали для подальшого аналізу через високу спорідненість (таблиця 6) та відсутність мотивів глікозилювання NXS/T в CDR.

Таблиця 6

K_D (нМ) антитіл миші до мономера тау-білка людини. Дані являють собою результат використання моделі зв'язування 1:1.

Антитіло	K_D (нМ)	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)
26C1	17	4×10^4	7×10^{-4}
94B2-C1	6	5×10^4	3×10^{-4}
54C1-H11	0,6	3×10^5	2×10^{-4}
3A4-H4	12	3×10^4	3×10^{-4}
37D3-H9	1,6	1×10^5	1×10^{-4}
19H6-F7	10	2×10^5	2×10^{-3}
11E10-B8	108	2×10^5	2×10^{-2}
55E7-F11	171	2×10^5	4×10^{-2}
125B11-H3	5	5×10^4	3×10^{-4}
123E9-A1	52	4×10^5	2×10^{-2}
30G1-B2	20	4×10^5	8×10^{-3}

Таблиця 6

K_D (нМ) антитіл миші до мономера тау-білка людини. Дані являють собою результат використання моделі зв'язування 1:1.

Антитіло	K_D (нМ)	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)
66F5-A1	105	8×10^4	8×10^{-3}
89F4-A1	27	3×10^5	1×10^{-3}
93A8-D2	6	3×10^5	2×10^{-3}
126F11-G11	3	2×10^6	4×10^{-3}
52F6-F11.v1	15	5×10^4	7×10^{-4}
52F6-F11.v2	5	7×10^4	4×10^{-4}

37D3-H9 демонструвало авідність при зв'язуванні з тау-білком

Мономерний тау-білок людини ковалентно приєднували до чипа Biacore Series S CM5 з використанням набору Biacore Amine Coupling Kit (GE Life Sciences), що призводило до іммобілізації до рівня приблизно 128 PE. Пряме зв'язування 37D3-H9 з Fab й IgG форматами відслідковували з використанням експериментального формату кінетики протягом одиночного циклу з п'ятьма періодами асоціації по 300 с і концентрацій антитіла 1, 2, 4, 8 і 16 нМ (IgG) або 5, 10, 20, 40 і 80 нМ (Fab). Дисоціацію відслідковували протягом 7200 секунд (Fab) або 14400 секунд (IgG). Значення швидкості дисоціації розраховували шляхом апроксимації моделі зв'язування 1:1 стосовно даних. Розраховані швидкості дисоціації становили $5,0 \times 10^{-4}$ для Fab 37D3-H9 і $1,1 \times 10^{-5}$ для IgG 37D3-H9 (45-кратна відмінність). На Фігурі 5 показана відмінність швидкостей дисоціації Fab (лівий графік) й IgG (правий графік), що вказувало на демонстрацію авідності IgG 37D3-H9.

Приклад 4: Гуманізація антитіл проти тау-білка

Антитіло 37D 3-H9 гуманізували шляхом пересадження CDR антитіла та вибраних каркасних залишків варіабельної області на консенсусний каркас антитіла людини (Dennis, M.S. (2010). CDR repair: A novel approach to antibody humanization. In Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing, S. J. Shire, W. Gombotz, K. Bechtold-Peters and J. Andya, eds. (Springer, New York), pp. 9-28). Оцінювали пересадження на консенсусний каркас VH3, Vk2 і Vk1. Пересадження важкого ланцюга включало залишок антитіла миші у положенні 49 (система нумерації за Kabat). Пересадження Vk2 включало залишки антитіла миші у положеннях 2 і 4 каркаса. Пересадження Vk1 включало залишки антитіла миші у положеннях 2, 4 і 43 каркаса. Гуманізовані варіанти сконструювали шляхом синтезу генів і субклонування в експресійних векторах ссавців для IgG1 або IgG4 і каппа-ланцюга людини. Антитіла експресували шляхом спільної трансфекції плазмід важкого та легкого ланцюга в клітини CHO й очищали з використанням афінної смоли Mabselect Sure. Гуманізовані варіанти піддали скринінгу на предмет спорідненості до мономера тау-білка людини з використанням набору Biacore для захоплення IgG людини, чипа Series S CM5 і приладу Biacore T200. Антитіла розбавляли до 2 мкг/мл і захоплювали протягом 15 секунд при швидкості 10 мкл/хв. Асоціацію та дисоціацію 100, 33, 11 і 3,7 нМ мономера тау-білка людини в 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05 %, Tween-20 (буфер для аналізу, HBSP) відслідковували протягом 180 і 600 секунд, відповідно, при швидкості потоку 30 мкл/хв. До результатів застосували модель зв'язування 1:1 (таблиця 7).

Таблиця 7

Скринінг спорідненості гуманізованих варіантів мономерного тау-білка людини

Варіант антитіла	Каркас легкого ланцюга	K_D (нМ)
hu37D3-H9.v1	Каппа1	4,1
hu37D3-H9.v2	Каппа1	5,6
hu37D3-H9.v3	Каппа1	8,8
hu37D3-H9.v4	Каппа1	8,2
hu37D3-H9.v5	Каппа-2	1,9
hu37D3-H9.v6	Каппа-2	3,5
hu37D3-H9.v7	Каппа-2	27,0
hu37D3-H9.v8	Каппа-2	10,2

Таблиця 7

Скринінг спорідненості гуманізованих варіантів мономерного тау-білка людини

Варіант антитіла	Каркас легкого ланцюга	K _D (нМ)
hu37D3-H9.v9	Каппа-2	13,2
hu37D3-H9.v10	Каппа-2	14,3
hu37D3-H9.v11	Каппа-2	74,8
hu37D3-H9.v12	Каппа-2	21,6
hu37D3-H9.v13	Каппа-2	9,0
hu37D3-H9.v14	Каппа-2	10,8
hu37D3-H9.v15	Каппа-2	19,0
hu37D3-H9.v16	Каппа-2	27,2
hu37D3-H9.v17	Каппа-2	8,1
hu37D3-H9.v18	Каппа-2	13,4
hu37D3-H9.v19	Каппа-2	55,7
hu37D3-H9.v20	Каппа-2	36,9
hu37D3-H9.v21	Каппа-2	38,1
hu37D3-H9.v22	Каппа-2	36,6
hu37D3-H9.v23	Каппа-2	81,1
hu37D3-H9.v24	Каппа-2	56,6

- 5 Варіанти антитіла hu37D3-H9.v1, hu37D3-H9.v2, hu37D3-H9.v5 і hu37D3-H9.v6 надалі досліджували за допомогою поверхневого плазмонного резонансу з додатковими концентраціями антитіла та більше тривалим часом асоціації/дисоціації. Ці варіанти аналізували в розширеному діапазоні концентрацій мономера тау-білка людини (1,2, 3,7, 11,1, 33,3, 100 нМ) і при збільшеній тривалості асоціації (300 секунд) та дисоціації (1200 секунд). До результатів застосували модель зв'язування 1:1 (таблиця 8).

Таблиця 8

Докладний аналіз кінетики зв'язування відібраних варіантів із тау-білком людини за допомогою поверхневого плазмонного резонансу

Варіант антитіла	Каркас легкого ланцюга	K _D (нМ)
hu37D3-H9.v1	Каппа1	1,1 нМ, 1,0 нМ
hu37D3-H9.v2	Каппа1	1,2 нМ
hu37D3-H9.v5	Каппа-2	0,8 нМ
hu37D3-H9.v6	Каппа-2	1,4 нМ

- 10 У деякі антитіла IgG4 включали мутацію YTE (M252Y/S254T/T256E). Описано, що мутації домена зв'язування рецептора Fc немовлят (FcRn), наприклад, M252Y, S254T і T256E (YTE) збільшували зв'язування з FcRn і тим самим збільшували час напівжиття антитіл. Див. Оpubліковану патентну заявку США № 2003/0190311 і Dall'Acqua et al. J. Biol. Chem. 281:23514-23524 (2006).
- 15 Антитіло 125B11-H3 гуманізували з використанням консенсусних каркасів VH3 і Vk1. Пересадження важкого ланцюга включало залишки антитіла миші у положенні 78 (система нумерації за Kabat). Пересадження Vk1 включало залишки антитіла миші у положеннях 43 і 87 каркаса. Легкий ланцюг 113F5-F7 також гуманізували з використанням каркаса Vk1 і додаткових залишків антитіла миші у положеннях 43 і 87.
- 20 Гуманізовані варіанти важких ланцюгів (125B11) і легких ланцюгів (125B11 і 113F5-F7) спільно трансфікували в декількох комбінаціях й очищали в 96-ямковому форматі, як описано вище. Потім гуманізовані варіанти піддали скринінгу на предмет спорідненості до мономера тау-білка людини з використанням набору Biacore для захоплення IgG людини, чипа Series S CM5 і приладу Biacore T200. Антитіла розбавляли до 2 мкг/мл і захоплювали протягом 15 секунд при швидкості 10 мкл/хв. Асоціацію та дисоціацію 0, 100 і 500 нМ мономера тау-білка людини в HBS-P відслідковували протягом 180 і 300 секунд, відповідно, при швидкості потоку 40 мкл/хв. До результатів застосували модель зв'язування 1:1 (таблиця 9).
- 25

Таблиця 9

**Скринінг гуманізованих варіантів 125B11-H3 і 113F5-F7
за допомогою поверхневого плазмонного резонансу**

K _D при скринінгу (нМ)		Гуманізований варіант важкого ланцюга 125B11					
		HC1	HC2	HC3	HC4	HC5	HC6
Гуманізований варіант легкого ланцюга 125B11	LC1	16,19	18	18	15	85	-
	LC2	20	20	19	14	-*	NT
	LC3	21	23	20	15	-	-
	LC4	23	22	20	17	>100	>100
Гуманізований варіант легкого ланцюга 113F5-F7	LC1	57	61	54	44	-	-
	LC2	67	68	55	47	-	-
	LC3	61	64	54	47	>100	-
	LC4	71	77	65	51	-	-

* Мінімальне зв'язування з мономером тау-білка

NT = не тестували

Варіанти hu125B11.v17 (HC3+LC1), hu125B11.v26 (HC4+LC2) і hu125B11.v28 (HC4+LC4) відібрали для аналізу кінетики з високим дозволом на підставі скринінгу спорідненості (таблиця 10). Антитіло 94B2-C1 гуманізували з використанням каркасів VH1 і Vk2. Пересадження важкого ланцюга також включало залишки антитіла миші у положенні 28, 29, 67, 69, 71 і 73 (система нумерації за Kabat). Пересадження Vk2 включало залишки антитіла миші у положеннях 2, 36 і 46 каркаса. Комбінації восьми важких ланцюгів і восьми легких ланцюгів експресували, очищали і піддали скринінгу за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР), як описано вище для 125B11. Результати ППР-скринінгу представлені в таблиці 11. Варіант hu94B2.v105 (варіант важкого ланцюга 94B2.HC1, варіант легкого ланцюга 94B2.LC13) відібрали для докладного ППР-дослідження (таблиця 11).

Таблиця 10

Кінетичні дані для відібраних гуманізованих варіантів антитіл проти тау-білка

Антитіло	Ізотип	K _D (нМ)	k _{on} (1/Мс)	k _{off} (1/с)
hu125B11.v17	hlgG1	10,5	$0,8 \times 10^5$	$0,8 \times 10^{-3}$
hu125B11.v26	hlgG1	9,5	$0,7 \times 10^5$	$0,7 \times 10^{-3}$
hu125B11.v28	hlgG1	10,2	$0,7 \times 10^5$	$0,7 \times 10^{-3}$
hu94B2.v105	hlgG1	3,7	$0,8 \times 10^5$	$0,3 \times 10^{-3}$

Таблиця 11

Скринінг гуманізованих варіантів 94B2 за допомогою поверхневого плазмонного резонансу

K _D при скринінгу (нМ)		Гуманізований варіант легкого ланцюга 94B2:							
		LC9	LC10	LC11	LC12	LC13	LC14	LC15	LC16
Гуманізований варіант важкого ланцюга 94B2:	HC1	3,8*	§	91,5	§	4,1 [¶]	§	104,0	§
	HC2	5,7	§	89,6	§	7,4	NT	99,6	§
	HC3	2,0	§	69,3	§	3,8	§	64,1	§
	HC4	61,9	§	8	§	64,1	§	8	§
	HC5	2,7	§	62,6	§	4,0	§	72,6	§
	HC6	0,9	§	70,1	§	3,0	§	74,1	§
	HC7	52,9	§	8	§	57,8	§	8	§
	HC8	1,0	§	44,3	§	2,4	§	51,5	§

* Середнє по n=3 повторностям.

¶ hu94B2.v105.

§ Спостерігали мінімальне зв'язування з мономером тау-білка.

NT = не тестували

Приклад 5: Аналіз стабільності гуманізованих антитіл проти тау-білка Ідентифікація хімічної нестабільності

Зразки антитіл зазнавали термічної стресової обробки, щоб імітувати стабільність протягом строку придатності продукту. Зразки діалізували із заміною буфера в 20 мМ ацетатний буфер, pH 5,5 або фосфатний буфер, pH 7,4, і розбавляли до концентрації 1 мг/мл. Один мл зразка піддавали стресовій обробці при 40 °C протягом 2 тижнів, а другий зберігали при -70 °C в якості контролю. Потім обидва зразка гідролізували з використанням трипсину для одержання пептидів, які можна було аналізувати з використанням рідинної хроматографії (PX) - мас-спектрометрії (МС). Для кожного пептиду зі зразка були отримані час утримання (за допомогою PX), а також точна маса з високим дозволом й інформація про іонну фрагментацію пептиду (інформація про амінокислотну послідовність) (за допомогою МС). Для пептидів, що представляють інтерес (нативних і модифікованих пептидних іонів), одержали хроматограми екстрагованих іонів (XIC) з наборів даних у вікні ± 10 м. Д.; піки інтегрували для визначення площі. Відносний відсоток модифікації розраховували для кожного зразка за формулою "(площа модифікованого пептиду) розділити на (площа модифікованого пептиду плюс площа нативного пептиду) помножити на 100". Потім ці відносні процентні показники порівнювали в контрольному ($t=0$) та підданому стресу ($t=2$ тижня) зразках. Показані процентні показники відображали результат вирахування контрольного ($t=0$) значення зі значення після стресу ($t=2$ тижня). Аналіз дезамідування антитіл hu37D3-H9.v1 і hu37D3-H9.v5 призвів до спостереження, що послідовність N²⁸G²⁹N³⁰ (нумерація за Kabat) в межах CDR-1 легкого ланцюга була піддана дезамідуванню. Збільшення для дезамідованої послідовності N²⁸G²⁹N³⁰ склало 16,5 % для hu37D3-H9.v1 і 11 % для hu37D3-H9.v5.

Вплив дезамідування антитіла на зв'язування з антигеном

Для оцінки впливу дезамідування N²⁸ на спорідненість до тау-білка людини було бажано одержати два зразки з чітко різним статусом дезамідування N²⁸. Hu37D3-H9.v5 hlgG4. S228P інкубували при температурі 40 °C протягом двох тижнів у концентрації 1 мг/мл у фізіологічному розчині з фосфатним буфером, pH 7,4. Дезамідування мотиву N²⁸G²⁹ вимірювали за допомогою PX-МС/МС. Посилення дезамідування в зразку після стресу ($t=2$ тижня) склало 43,1 % у порівнянні зі зразком, що не зазнали стресу ($t=0$). Антитіла, які зазнали і не зазнали стресу, аналізували на предмет зв'язування з тау-білком за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (Biacore) з використанням набору GE Biacore для захоплення IgG людини і чипа Series S CM5. hlgG розбавляли до 2 мкг/мл 10 мМ HEPES pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween 20 (буфер для аналізу, HBSP) і виконували захоплення при швидкості потоку 10 мкл/хв. протягом 15 секунд (зразок t_0) або 17 секунд (зразок t_2). Дані про кінетику збирали для мономера тау-білка людини, введеного в концентрації 0, 3,1, 6,3, 12,5, 25, 25, 50 і 100 нМ в HBSP при швидкості потоку 30 мкл/хв., тривалості фази асоціації 300 с і фази дисоціації - 1800 с. Між циклами поверхня регенерували з використанням 30-секундної ін'єкції 3 М хлориду магнію при швидкості 10 мкл/хв. Модель зв'язування 1:1 апроксимували з використанням настроювань приладу за замовчуванням, включаючи локальну апроксимацію параметра "RI". Результати, показані на Фігурі 6 і в таблиці 12, демонструють, що хоча в даному експерименті рівень іммобілізації антитіла після стресу вище, ніж для антитіла, що не зазнав стресу, амплітуда сигналу зв'язування тау-білка (представлена величиною параметра R_{max}) була помітно нижче. Після нормування значення R_{max} за відмінностями у рівні захоплення виявилось, що зразок після стресу ($t=2$ тижня) демонстрував приблизно половинну зв'язуючу здатність стосовно загального тау-білка у порівнянні зі зразком, що не зазнали стресу (на що вказувало 56 % зниження нормованого R_{max}). Розрахована спорідненість, мабуть, не змінилося: в даному аналізі різниця K_D між зразками " $t=0$ " і " $t=2$ тижня" склала менше 2 % (K_D = 0,7 нМ для $t=0$ і $t=2$ тижня). Ці результати узгоджувалися з тим, що зразок " $t=2$ тижня" містив значно зменшену популяцію антитіла з високою спорідненістю.

Таблиця 12

Відносне зв'язування зразків hu 37D3-H9.v5, що зазнали і не знали стресу, з мономерним тау-білком, виміряне за допомогою поверхневого плазмонного резонансу

Зразок hu37D3-H9.v5 hlgG4.S228 P	Рівень ліганду (PE)	Rmax (PE)	Нормований Rmax (=Rmax / рівень ліганду)	Зміна нормованого Rmax
Контроль (t=0)	102,9	47,7	0,46	H/B
Після стресу (t=2 тижня)	146,8	30,2	0,21	-56 %

З урахуванням очікувань, що дезамідування аспарагіну призводить до утворення аспарагінової кислоти й ізоаспарагінової кислоти (Bischoff R.& Kolbe H.V.J. (1994). J. Chromat. 5, 662, р. 261-278), аналізували вплив заміни N²⁸ на D²⁸ (варіант hu37D3-H9.v5 N28D) на спорідненість до мономера тау-білка людини. Спорідненість оцінювали при 25° С за допомогою приладу Biacore T200, набору GE Biacore для захоплення IgG людини і чипа CM5 Series S. hlgG розбавляли до 2 мкг/мл 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 (буфер для аналізу, HBSP) і виконували захоплення при швидкості потоку 10 мкл/хв. протягом 22 секунд. Дані про кінетику збирали для мономера тау-білка людини, введеного в концентрації 0, 6,3, 12,5, 25, 50, 100, 200 і 400 нМ в HBSP при швидкості потоку 30 мкл/хв., тривалості фази асоціації 300 с і фази дисоціації - 600 с. Між циклами поверхня регенерували з використанням 30-секундної ін'єкції 3 М хлориду магнію при швидкості 10 мкл/хв. При аналізі кінетики за отриманими даними апроксимували модель зв'язування 1:1 і розраховували спорідненість hu37D3-H9.v5 і hu37D3-H9.v5.3 (також називаного у даному документі hu37D3-H9.v5 N28D). Параметри, які використані для апроксимації моделі зв'язування 1:1, включали налаштування приладу за замовчуванням для локальної апроксимації параметра "RI". Результати показані на фігурі 7 і в таблиці 13.

Розрахована K_D для варіанта hu37D3-H9.v5 N28D склала 160 × 10⁻⁹ М у порівнянні з 1,5 × 10⁻⁹ М (середнє, n = 4, визначення в рамках одного експерименту) для hu37D3-H9.v5, проаналізованого в тих самих умовах. Таким чином, перетворення N²⁸ в D²⁸ призводить до > 100-кратного зниження спорідненості. Враховуючи порівняно низьку спорідненість та порівняно швидку кінетику варіанта N28D hu37D3-H9.v5, автори винаходу вирішили, що при аналізі кінетики суміші варіантів N²⁸ і D²⁸ буде домінувати популяція з більше високою спорідненістю, і що на присутність варіантів зі зниженою спорідненістю може вказувати зниження нормованого Rmax. Для перевірки цього міркування профілі зв'язування варіантів антитіла hu37D3-H9.v5 і hu37D3-H9.v5 N28D з тау-білком порівняли з профілем зв'язування суміші двох даних антитіл у рівних кількостях. У порівнянні з чистим hu37D3-H9.v5 суміш hu37D3-H9.v5 і hu37D3-H9.v5 N28D 1:1 призвела до 45 % зниження нормованого Rmax (таблиця 13). Автори винаходу дійшли висновку, що зміни нормованого Rmax після теплового стресу можуть вказувати на скорочення популяції антитіла з високою спорідненістю в зразку після стресу. Автори винаходу вважали, що зміни нормованого Rmax можна використовувати для скринінгу варіантів hu37D3-H9 на предмет поліпшеної стабільності.

Таблиця 13

Зміни нормованого Rmax, спостережувані при тепловому стресі hu37D3-H9.v5 і після змішування hu37D3-H9.v5 з очікуваним продуктом дезамідування hu37D3-H9.v5 N28D

Зразок	K _D (нМ)	Rmax (PE)	Зниження нормованого Rmax у порівнянні з еталоном	Коментарі
hu37D3-H9.v5 hlgG1	1,5±0,2	76,1±0,4	Еталон	Середнє +/-стандартне відхилення для чотирьох аналізів у межах одного експерименту
hu37D3-H9.v5 N28D	160	81,0	4 %	

Таблиця 13

Зміни нормованого Rmax, спостережувані при тепловому стресі hu37D3-H9.v5 і після змішування hu37D3-H9.v5 з очікуваним продуктом дезамідування hu37D3-H9.v5 N28D

Зразок	K _D (нМ)	Rmax (PE)	Зниження нормованого Rmax у порівнянні з еталоном	Коментарі
hlgG1				
hu37D3-H9.v5 і hu37D3-H9.v5 N28D hlgG1	2,0	46,4	45 %	Два антитіла змішали в співвідношенні 1:1
hu37D3-H9.v5 hlgG4.S228P, t=0	1,5	68,8	3 %	Контроль для зразка після стресу
hu37D3-H9.v5 hlgG4.S228P, t=2 тижня	1,5	33,4	54 %	зразка після стресу

* Нормований Rmax=Rmax (PE) / рівень ліганду (PE). Нормований Rmax для етального антитіла = 0,33 (середнє значення по чотирьом визначенням у рамках одного експерименту, стандартне відхилення <0,01).

Оптимізація та відбір антитіл

За допомогою Biacore виконали оцінку дев'яности варіантів 37D3-H9 з метою порівняння їх функціональної стабільності при наявності двотижневого періоду теплового стресу (40 °C) або без нього. Ці варіанти включали більшість одиночних мутацій мотиву N²⁸G²⁹N³⁰T³¹, подвійних мутантів, що містять мутацію G29A, подвійні мутації Asn-28 і Tyr-32, здатні функціонально замінити їх на залишки, з'єднані водневими зв'язками, а також усі можливі перестановки залишків 2, 4, 33 і 93, а також залишків, які присутні у вихідному антитілі 37D3-H9 або відповідних залишків ембріонального варіанта. Крім того, протестували мутації в контексті залишку 1 (Asp або Glu), який не виявляв впливу на спорідненість або стабільність залишку Asn-28.

Антитіла експресували шляхом тимчасової трансфекції клітин Expi293 в 96-ямковому форматі й автоматизованого очищення на рідинній системі Tecan freedom EVO 200 з 500-мкл голівкою MCA96. Коротенько, IgG в 1 мл культури захоплювали, використовуючи користувацькі колонки-наконечники, що містили 20 мкл смоли MabSelect SuRe (Glygen Corp & GE Healthcare). Після промивання 1 X PBS (pH 7,4) IgG елюювали в 160 мкл 50 мМ фосфорної кислоти (pH 3) і нейтралізували 12 мкл 20 X PBS (pH 11). Колонки-наконечники MabSelect SuRe наконечник колони очищали 0,1 М NaOH і регенерували 1 X PBS (pH 7,4), що дозволяло використовувати їх до 15 разів підряд. Очищені антитіла в 96-ямковому форматі нормували до концентрації 0,1 мг/мл з використанням роботизованої рідинної системи Hamilton Star. Зразки "до стресу" зберігалися при температурі приблизно 4 °C, а зразки "після стресу" інкубували при 40 °C протягом двох тижнів в апараті для ПЛР. Функціональну стабільність варіантів порівнювали за допомогою кінетичних експериментів з використанням поверхневого плазмонного резонансу та препаратів антитіл "до стресу" та "після стресу". Оцінку антитіл виконували з використанням чипа CM5 Series S для захоплення антитіл людини, набору GE Biacore для захоплення IgG людини і приладу Biacore T200. Антитіла, розведені до 2 мкг/мл, іммобілізували при часі ін'єкції 15 секунд і швидкості потоку 10 мкл/хв. Зв'язування з мономером тау-білка в концентрації 0 нМ, 26,5 нМ і 265 нМ при 25 °C і швидкості потоку 40 мкл/хв. відслідковували протягом фази асоціації тривалістю 180 секунд з наступною фазою дисоціації тривалістю 300 секунд. Зразки аналізували в 10 мМ HEPES pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween 20 (HBSP) з використанням формату кінетики з множинними циклами. Дані аналізували з використанням програмного забезпечення BIAevaluation, виконуючи апроксимацію моделі зв'язування 1:1. Отримані значення спорідненості (K_D) наведені на Фігурі 8A-D. Крім того, розраховували індекс стабільності, виходячи з міркування, що антитіла з погіршеною спорідненістю (внаслідок, наприклад, дезамідування ключових залишків), повинні вносити рівний вклад в рівень захоплення IgG ("рівень ліганду"), але менший внесок у вимірюване зв'язування тау-білка, і що це повинно відображатися в експериментально отриманому значенні Rmax. Для врахування змін кількості кожного захопленого антитіла Rmax нормували за рівнем захоплення антитіл

(вимірюваному як "рівень ліганду", кількість одиниць відповіді при захопленні антитіла). Таким чином, нормований Rmax розраховували як відношення експериментального значення Rmax (одиниці = PE) до "рівня ліганду" (показнику оцінки, що являє собою кількість PE, зареєстровану на етапі захоплення hlgG, одиниці = PE), а індекс стабільності у цьому випадку розраховували як відношення нормованого Rmax (після стресу) до нормованого Rmax (до стресу).

Відібрані антитіла експресували шляхом тимчасової трансфекції клітин CHO й очищали. Ці антитіла потім піддавали стресу протягом двох тижнів у концентрації 1 мг/мл й аналізували дезамідування за допомогою PX-MC/MC з використанням RCM-триптичного пептидного картування з відновленням DTT, келуванням IAA та гідролізом при pH 8,2. Результати (таблиця 14) показали, що варіант hu37D3-H9.v28.A4 мав знижену схильність дезамідуванню мотиву N²⁸G²⁹N³⁰. Зниження дезамідування hu37D3-H9.v28.A4 було несподіваним, оскільки залишки не знаходяться у безпосередній близькості від залишка Asn-28 (Фігура 9), і неясно, яким чином мутація F33L могла стабілізувати Asn-28.

Таблиця 14

Стабільність варіантів hu37D3-H9.v28.A4 у стрес-тестах щодо дезамідування

Антитіло		Умови теплового стресу	Посилення дезамідування N ²⁸ G ²⁹ N ³⁰ легкого ланцюга
hu37D3-H9.v1	hlgG1	40 °C в ацетатному буфері, pH5,5	16,5 %
hu37D3-H9.v5	hlgG1	40 °C в ацетатному буфері, pH5,5	11 %
hu37D3-H9.v28.A4	hlgG1	40 °C в ацетатному буфері, pH5,5	N ²⁸ :2,8 % N ³⁰ :0,2 %
		37 °C у PBS, pH 7,4	N ²⁸ :5,3 % N ³⁰ :H/B
	hlgG4.S228P.YTE	40 °C в ацетатному буфері, pH5,5	N ²⁸ :0 % N ³⁰ :0 %
		37 °C у PBS, pH 7,4	N ²⁸ :10,4 % N ³⁰ :2,0 %

Приклад 6: Відбір і дослідження характеристик гуманізованого антитіла проти тау-білка

Відбір і дослідження характеристик антитіла: зв'язування з тау-білком людини

Спорідненість відібраних антитіл оцінювали при 25° C за допомогою приладу Biacore T200, набору GE Biacore для захоплення IgG людини і чипа CM5 Series S. hlgG розбавляли до 0,25 мкг/мл 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 (буфер для аналізу, HBSP) і виконували захоплення при швидкості потоку 10 мкл/хв. протягом 150 секунд. Дані про кінетику збирали для мономера тау-білка людини, введеного в концентрації 0, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 11, 33 і 100 нМ в HBSP при швидкості потоку 30 мкл/хв., тривалості фази асоціації 300 с і фази дисоціації - 600 с. Між циклами поверхню регенерували з використанням двох послідовних 30-секундних ін'єкцій 3 M MgCl при швидкості 10 мкл/хв. Дані апроксимували згідно з моделлю зв'язування 1:1 (таблиця 15).

Таблиця 15

Кінетичні дані для відібраних гуманізованих варіантів антитіл проти тау-білка

Антитіло	Ізотип	K _D (нМ)	K _{on} (1/Мс)	K _{off} (1/с)
hu37D3-H9.v28.A4	hlgG1	1,5	6,9 × 10 ⁵	1,1 × 10 ⁻³
hu37D3-H9.v5	hlgG1	1,0	7,5 × 10 ⁵	0,8 × 10 ⁻³
hu37D3-H9.v5	hlgG4.S228P	1,3	7,1 × 10 ⁵	0,9 × 10 ⁻³
hu37D3-H9.v1	hlgG4.S228P	2,0	6,7 × 10 ⁵	1,3 × 10 ⁻³

Дослідження характеристик антитіл: зв'язування з тау-білком людини у форматі MgG4.S228P.YTE

Спорідненість оцінювали при 25 °C за допомогою приладу Biacore T200, набору GE Biacore для захоплення FAb людини і чипа CM5 Series S. hlgG розбавляли до 0,5 мкг/мл 10 mM HEPES

- рН 7,4, 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween 20 (буфер для аналізу, HBSP) і виконували захоплення при швидкості потоку 10 мкл/хв. протягом 180 секунд. Дані про кінетику збирали для мономера тау-білка людини, введеного в концентрації 0, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 11, 33 і 100 нМ в HBSP при швидкості потоку 30 мкл/хв., тривалості фази асоціації 300 с і фази дисоціації - 600 с. Між циклами поверхню регенерували з використанням двох послідовних 60-секундних ін'єкцій 10 мМ гліцину (рН 2,1). Дані апроксимували згідно з моделлю зв'язування 1:1. Дані про кінетику представлені в таблиці 16.

Таблиця 16

Кінетика зв'язування hu37D3-H9.v28.A4 hlgG4.S228P.YTE з мономерним тау-білком людини при аналізі з використанням поверхневого плазмонного резонансу

Антитіло	Препарат антитіл	K _D (нМ)	K _{on} (1/Мс)	K _{off} (1/с)
hu37D3-H9.v28.A4	Преп. 1	1,4	6×10^5	9×10^{-4}
hlgG4.S228P.YTE	Преп. 2	1,4	6×10^5	9×10^{-4}

- Дослідження характеристик антитіл: зв'язування з тау-білком яванського макака
- Спорідненість оцінювали при 25 °С за допомогою приладу Biacore T200, набору GE Biacore для захоплення IgG людини і чипа CM5 Series S. hlgG розбавляли до 2 мкг/мл 10 мМ HEPES рН 7,4, 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween 20 (буфер для аналізу, HBSP) і виконували захоплення при швидкості потоку 10 мкл/хв. протягом 15 секунд. Дані про кінетику збирали для мономера тау-білка людини, введеного в як мінімум п'яти різних ненульових концентраціях від 1,2 і 100 нМ в одній повторності з концентрації. Кінетику оцінювали при швидкості потоку 30 мкл/хв., тривалості фази асоціації 300 секунд і тривалості фази дисоціації 600 секунд. Між циклами виконували 30-секундну регенеруючу ін'єкцію 3 М хлориду магнію при швидкості 10 мкл/хв. Результати апроксимували згідно з моделлю зв'язування 1:1. Дані про кінетику представлені в таблиці 17.

Таблиця 17

Спорідненість гуманізованих антитіл проти тау-білка до мономерного тау-білку яванського макака

Антитіло	Рівень ліганду (PE)	Rmax (PE)	K _D (нМ)	K _{on} (1/Мс)	K _{off} (1/с)
hu37D3.v28.A4	113,9	62,6	0,7	17×10^5	1×10^{-3}
hu37D3.v28.F1	126,9	61,2	1,3	12×10^5	2×10^{-3}
hu37D3.v28.A12	162,6	85,2	1,0	17×10^5	2×10^{-3}
hu37D3.v29.2	168,6	86,0	1,4	17×10^5	2×10^{-3}
hu37D3-H9.v5	125,1	55,5	0,6	15×10^5	1×10^{-3}
hu37D3-H9.v1	130,2	51,7	0,8	20×10^5	1×10^{-3}

Гуманізовані антитіла hu37D3.v28.A4 і hu37D3.v28.F1 також зв'язувалися з фосфорилованим тау-білком (pTau).

- Приклад 7: Фармакокінетика антитіла проти тау-білка.
- Для оцінки фармакокінетики антитіла 37D3-H9 mlgG2a проти тау-білка in vivo мишам C57BL/6, що знаходяться у свідомості, однократно вводили внутрішньовенну (в/в) або внутрішньочеревинну (в/ч) болюсну ін'єкцію в дозі 10 мг/кг. У різні моменти часу аж до 28 днів після введення дози збирали зразки плазми з метою визначення концентрації антитіла проти тау-білка.
- Концентрації введеного антитіла у плазмі миші вимірювали за допомогою універсального твердофазного ІФА, використовуючи іммобілізоване антитіло миші проти mlgG2a з наступним додаванням зразків плазми, починаючи з розведення 1:100, і закінчуючи додаванням кон'югату "антитіло миші проти mlgG2a-біотин", а потім стрептавідину, кон'югованого з пероксидазою хрому, з метою виявлення. Аналіз характеризувався каліброваною кривою у діапазоні 1,56-200 нг/мл і межею виявлення 0,16 мкг/мл. Результати менше зазначеної межі виявлення реєстрували як "менше реєстрованого значення (LTR)".

На Фігурі 10 показані результати фармакокінетичного аналізу антитіла 37D3-H9 mlgG2a проти тау-білка. Вплив і виведення антитіла 37D3-H9 mlgG2a проти тау-білка в мишей C57BL/6 дикого типу були аналогічні зазначеним параметрам ізотипового контрольного антитіла, причому виведення становило 6,31 мл/доба/кг.

Для оцінки фармакокінетики антитіла 94B2-C1 mlgG2a проти тау-білка й антитіла 125B11-H3 mlgG2a проти тау-білка *in vivo* мишам C57BL/6, що знаходяться у свідомості, однократно вводили в/ч болюсну ін'єкцію антитіла в дозі 10 мг/кг. У різні моменти часу аж до 28 днів після введення дози збирали зразки плазми з метою визначення концентрації антитіла проти тау-білка.

Концентрації введеного антитіла у плазмі миші вимірювали за допомогою універсального твердофазного ІФА, використовуючи іммобілізоване антитіло миші проти mlgG2a з наступним додаванням зразків плазми, починаючи з розведення 1:100, і закінчуючи додаванням кон'югату "антитіло миші проти mlgG2a-біотин", а потім стрептавідину, кон'югованого з пероксидазою хрому, з метою виявлення. Аналіз характеризувався каліброваною кривою у діапазоні 0,78-100 нг/мл і межею виявлення 0,078 мкг/мл. Концентрації також вимірювали за допомогою специфічного твердофазного ІФА, використовуючи іммобілізований рекомбінантний тау-білок з наступним додаванням зразків плазми, починаючи з розведення 1:10, і закінчуючи додаванням антитіла кози проти mlgG2a, кон'югованого з пероксидазою хрому, з метою виявлення. Аналіз характеризувався каліброваною кривою у діапазоні 0,078-10 нг/мл і межею виявлення 0,0008 мкг/мл. Результати менше зазначеної межі виявлення реєстрували як "менше реєстрованого значення (LTR)".

Результати цих експериментів наведені на Фігурах 16 і 17. Вплив і виведення антитіла 94B2 mlgG2a проти тау-білка в мишей C57BL/6 дикого типу були аналогічні відповідним параметрам ізотипового контрольного антитіла при стандартному аналізі концентрацій, однак при використанні специфічного аналізу вплив був більше низьким, а виведення більше швидким. Див. Фігуру 16. Виведення, обумовлене при стандартному аналізі, становило 4,06 мл/доба/кг, а при специфічному аналізі - 7,53 мл/доба/кг. Ці результати показують, що антитіло може згодом зазнати змін *in vivo*, які порушують його здатність розпізнавати свою мішень. Вплив і виведення антитіла 125B11-H3 mlgG2a проти тау-білка в мишей C57BL/6 дикого типу були аналогічні відповідним параметрам ізотипового контрольного антитіла, незалежно від виду аналізу, який використовували для одержання концентрацій. Див. Фігуру 17. Виведення, обумовлене при стандартному аналізі, становило 4,96 мл/доба/кг, а при специфічному аналізі - 4,90 мл/доба/кг.

У таблиці 18 показані фармакокінетичні параметри для антитіл 37D3-H9, 94B2-C1 і 125B11-H3 проти тау-білка в мишей.

Таблиця 18

Фармакокінетичні параметри антитіл проти тау-білка

	Спосіб введення	Аналіз	Смакс (мкг/мл)	ППKinf (мкг/мл*доба)	CL або CL/F (мл/доба/кг)
37D3-H9	в/в	Стандартний	185	1590	6,31
	в/ч	Стандартний	107	1680	6,76
94B2-C1	в/ч	Стандартний	151	2460	4,06
	в/ч	Специфічний	141	1330	4,91
125B11-H3	в/ч	Стандартний	127	2020	4,96
	в/ч	Специфічний	151	2040	4,90

Для оцінки фармакокінетики антитіл hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P і hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE *in vivo*, яванським макакам (*Macaca fascicularis*), що знаходяться у свідомості, вводили однократну в/в болюсну ін'єкцію в дозі 1 мг/кг. У різні моменти часу аж до 49 днів після введення дози збирали зразки плазми з метою визначення концентрації антитіла проти тау-білка.

Концентрації введеного антитіла у плазмі мавпи вимірювали за допомогою стандартного твердофазного ІФА, використовуючи іммобілізоване антитіло вівці проти IgG людини з наступним додаванням зразків плазми, починаючи з розведення 1:100, і закінчуючи додаванням антитіла кози проти IgG людини, кон'югованого з пероксидазою хрому, з метою виявлення. Аналіз характеризувався каліброваною кривою у діапазоні 0,156-20 нг/мл і межею виявлення 0,02 мкг/мл. Результати менше зазначеної межі виявлення реєстрували як "менше реєстрованого значення (LTR)".

На Фігурі 11 показані результати фармакокінетичного аналізу hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P і hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE. На фігурі 11 кожний набір даних являє собою дані для однієї тварини; лінії являють собою середні значення для всіх тварин у групі антитіла й аналізу. У таблиці 19 показані фармакокінетичні параметри hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P і hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE в яванських макак.

Таблиця 19

Фармакокінетичні параметри hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P і hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE в яванських макак

Антитіло	Аналіз	Смакс (мкг/мл)	ППKinf (доба*мкг/мл)	CL (мл/доба/кг)	Vss (мл/кг)
Антитіло hlgG4 проти gD	Стандартний	34,6	386	2,66	55,5
hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P	Стандартний	35,7±2,59	559±209	1,97±0,743	71,9±16,0
	Специфічний	35,4±1,37	419±89,9	2,47±0,581	60,8±3,49
hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P.YTE	Стандартний	34,5±5,23	578±43,5	1,74±0,125	60,5±1,87
	Специфічний	33,5±2,72	520±39,0	1,93±0,139	56,5±4,90

Приклад 8: Подальше дослідження епітопів антитіла проти тау-білка

Після порівняння зв'язування 37D3-H9 з біотинільованим мономерним тау-білком і біотинільованим пептидом (МАРТ10-24) також виконали оцінку зв'язування 37D3-H9 з додатковими біотинільованими пептидами. 96-ямкові планшети Nunc maxisorp покривали нейтравідином, розведеним до 2 мкг/мл 50 мМ натрій-карбонатним буфером, рН 9,6, при 4 °С протягом > 12 годин. Усі подальші етапи інкубування виконували при кімнатній температурі. Після покриття планшети блокували блокувальним буфером Superblock™ (PBS) (Thermo Fisher Scientific) протягом двох годин, потім ретельно промивали PBS з 0,05 % полісорбатом 20. Потім лунки піддавали впливу біотинільованих пептидів тау-білка (таблиця 20) або біотинільованого мономерного тау-білка з Avi-маркером у концентрації 1 мкг/мл протягом однієї години і промивали, як на попередніх етапах. Пептиди синтезували з використанням стандартних Fmoc-реакцій твердофазного синтезу (див., наприклад, Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach; Chan, W.C., White, P.D., Eds.; Oxford University Press: New York, 2000). Антитіла 37D3-H9 mlgG2a і hu37D3-H9.v5 hlgG1, послідовно розведені з концентрації 500 нМ до 50 нМ 90 % блокувальним буфером Superblock™ (PBS), піддавали зв'язуванню з лунками, покритими біотинільованим тау-білком, протягом 90 хвилин. Лунки промивали, як описано раніше, і виявляли зв'язане антитіло з використанням вторинного антитіла, кон'югованого з пероксидазою (Invitrogen / Life Technologies), розведеного 1/1000 блокувальним буфером Superblock™ (антитіла кролика проти IgG миші або антитілом кози проти IgG людини (H + L), відповідно). Через двадцять хвилин лунки промивали, як описано раніше, і за рахунок двокомпонентного субстрату TMB Microwell 2-component Substrate (KPL) розвивався сигнал. Реакцію зупиняли шляхом додавання 1 М фосфорної кислоти і вимірювали поглинання при довжині хвилі 450 нм за допомогою планшет-рідера SpectraMax M2.

Таблиця 20

Послідовності пептидів

Послідовність MART	Послідовність пептиду	SEQ ID NO:
MART (10-24)	VMEDHAGTYGLGDRK	592
MART(2-24)	AEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRK	593
MART(2-34)	AEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQD	594
MART (10-44)	VMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK	595

Результати описаного експерименту представлені на Фігурі 12. На Фігурі 12A показане зв'язування кожного із зазначених антитіл із зазначеними пептидами. Антитіла 37D3-H9 і 94B2-C1 продемонстрували сильне зв'язування з фрагментом 10-24 у зазначеному експерименті, а антитіло 94B2-C1 також продемонструвало сильне зв'язування з фрагментом 1-15. Антитіла 19F8-C11 і 123E9-A1 продемонстрували сильне зв'язування з фрагментом 19-33, а антитіло

89F4-A1 продемонструвало сильне зв'язування з фрагментами 28-42 і 37-51. Див. Фігуру 12A. Антитіла 37D3-H9 mlgG2a і hu37D3-H9.v5 hlgG1 продемонстрували сильне зв'язування з фрагментами 2-24 і 2-34 тау-білка та більше слабе зв'язування з фрагментом 10-24. Див. Фігури 12B і 12C. Ці результати показують, що антитіла 37D3-H9 mlgG2a і hu37D3-H9.v5 hlgG1 зв'язують епітоп тау-білка в межах амінокислот 2-24 зрілого білка.

В експерименті із заміщення за допомогою сканування аланіном виявили, що мутації Y18A і L20A порушували зв'язування антитіла миші 37D3-H9 з фрагментом тау-білка (фрагмент 2-21), що вказувало на те, що дане антитіло контактує з цими залишками тау-білка. З використанням серії 15-членних пептидів зі зсувом виявили, що антитіло миші 37D3-H9 демонструвало аналогічне зв'язування з фрагментом 9-23 і фрагментом 10-24, а також помірне зв'язування з фрагментами 7-21, 8-22 і 11-25. Приклад 9: Дослідження характеристик гуманізованих антитіл 37D3-H9 на основі клітин

Способи

Первинні культури гіпокампа та мікроглії, і спільна культура гіпокампа та мікроглії

Дисоційовані первинні нейрони гіпокампа одержали з 16-17-денних ембріонів мишей C57BL/6H дикого типу. Клітини висіювали на 8-ямкові стекла, покриті PDL/ламініном (Biocoat, 354688 Corning), з розрахунку 25000 клітин/ямку. Клітини покривали і підтримували в NbActiv4 (BrainBits), половину середовища заміняли два рази на тиждень. Рекombінатний тау-білок й антитіла наносили на культуру після 18 розподілів клітин.

Для одержання культури мікроглії відокремлювали кору та гіпокамп мишей C57BL/6H через 1-2 дня після народження та культивували в 10 % FBS у середовищі DMEM у культуральних колбах площею 225 мм протягом 10-12 днів. Культуральні колби акуратно струшували для дисоціації мікроглії; клітини в 10 % FBS у середовищі DMEM пересіювали на 8-ямкові стекла, покриті PDL/ламініном, з розрахунку 30000 клітин/ямку для візуалізації або 48-ямкові планшети без покриття (3548, Corning) з розрахунку 100000 клітин/ямку для аналізу цитокінів. Через 4-5 годин після покриття клітини перемикали на безсироваткове середовище DMEM з низьким вмістом глюкози і підтримували протягом ночі до обробки рекомбінантним тау-білком й антитілами. Спільні культури клітин гіпокампа та мікроглії повторно одержували шляхом пересіювання мікроглії, дисоційованої з 225 мм² культуральних колб, на 8-ямкові стекла з 18-DIV первинними нейронами гіпокампа (12500 клітин мікроглії та 25000 нейронів на лунку). Спільні культури обробляли рекомбінантним тау-білком й антитілом через 4 години після посіву мікроглії.

Обробка рекомбінантним тау-білком й антитілами in vitro

Для 18-DIV культур нейронів гіпокампа або спільних культур гіпокампа та мікроглії рекомбінантний олігомерний тау-білок людини й антитіла (по 500 нМ у співвідношенні 1:1) або контрольні матеріали попередньо інкубували в середовищі для культивування нейронів (кондиціоноване середовище 18-DIV культури гіпокампа: свіжа NbActiv4 1:1) протягом 1 години при 37 °C, а потім їх додавали до клітин. Клітини інкубували із сумішшю тау-білка й антитіла або контрольного матеріалу в середовищі протягом 72 годин (культура гіпокампа) або 48 годин (спільна культура гіпокампа та мікроглії). Клітини тричі промивали PBS перед фіксацією.

Для культур мікроглії рекомбінантний олігомерний тау-білок людини й антитіла або контрольні матеріали попередньо інкубували в концентрації по 125 нМ (імуногістохімія/візуалізація) або по 250 нМ (аналіз цитокінів) у середовищі DMEM з низьким вмістом глюкози під час відсутності сироватки протягом 1 години при 37 °C перед додаванням до клітин. Для імуногістохімії/візуалізації клітини інкубували із сумішшю тау-білка й антитіла або контрольного матеріалу протягом 10 хвилин і тричі промивали PBS перед фіксацією. Для аналізу цитокінів клітини інкубували із сумішшю тау-білка й антитіла або контрольного матеріалу протягом 24 годин, і середовище з кожної лунки збирали для аналізу цитокінів.

Імуногістохімія, візуалізація та кількісне визначення

Клітини фіксували 4 % параформальдегідом у PBS протягом 15 хв. і пермеабілізували 0,1 % тритоном X-100 у PBS протягом 10 хвилин. 10 % сироватку віслюка використовували для блокування; клітини інкубували з первинними антитілами у PBS протягом ночі при 4 °C, а потім з вторинними антитілами проти відповідних видів антитіл, отриманих у віслюка, міченими флуорофором Alexa (Invitrogen). Використані первинні антитіла являли собою антитіла проти тау-білка (DAKO), антитіла кролика проти N-кінцевої області тау-білка людини, що охоплює амінокислоти 11-24, антитіло проти MAP2 (ab5392, Abcam) й антитіло проти Iba-1 (ab5076, Abcam). На стекла наносили Prolong Gold DAPI (P36935, Invitrogen) та покривні стекла № 1.

Конфокальну флуоресцентну візуалізацію виконували за допомогою LSM780 (Carl Zeiss, Inc.) та програмного забезпечення Zen 2010 (Carl Zeiss, Inc.). Для візуалізації культур гіпокампа та спільних культур гіпокампа та мікроглії одержували зображення серії з 5 зрізів по осі z з

інтервалом 0,98 мкм з використанням об'єктива Plan Apochromat 20x/0,8 M27. Для аналізу фрагментації MAP2 сформували проекцію серії зображень з максимальною інтенсивністю по осі z й аналізували зображення з використанням Metamorph (Molecular Devices, Санта-Кларита, штат Каліфорнія, США). Для зниження рівня шуму використовували медіанний фільтр і зворотну

5

фільтрацію за найближчим сусіднім елементом. Довжину нейритів і тіла клітини аналізували за допомогою модуля розростання нейритів з наступною морфологічною обробкою. Фрагменти менше 15 пікселів (6,225 мкм) нормували за загальною довжиною сигналу для оцінки ступеня фрагментації MAP2.

10

Мікроглію візуалізували за допомогою об'єктива a-Plan Apochromat 100x/1,46 M27. Кількісне визначення поглинання рекомбінантного тау-білка в клітинах виконували за допомогою Image J (1.43u, 64-розрядна версія, National Institute of Health). ROI області клітин відображали вручну, використовуючи сигнал Iba-1 в якості еталона. Площу та комплексну інтенсивність імунореактивності тау-білка в ROI вимірювали з метою одержання імунореактивності тау-білка, нормованої за площею. Всі аналізи виконували без урахування умов експерименту.

15

Результати

Результати експерименту представлені на Фігурі 13. Як показано на Фігурі 13A, антитіла з повноцінною ефекторною функцією не мали протективні засоби проти токсичної дії тау-білка в спільній культурі нейронів і мікроглії. На Фігурі 13B показані зображення спільних культур нейронів і мікроглії, що контактували з олігомерним тау-білком й антитілами (нижній графік). Антитіло 37D3-H9 hlgG4 і hu37D3-H9 hlgG1 (N297G), що не має ефекторну функцію, мало захисні властивості проти токсичної дії тау-білка, у той час як 37D3-H9 hlgG1 не мало їх.

20

Приклад 10: Дозозалежне зниження патологічної дії тау-білка в мишей Tau Tg після введення 37D3-H9 IgG2a або 37D3-H9 IgG2a DANG

Трансгенних мишей, які експресують тау-білок P301L людини під контролем промотору Thy1 (Tau P301L-Tg), підтримували на фоні C57BL/6H (Charles River). Мишей Tau P301L-Tg й однопослідних мишей дикого типу розподіляли в експериментальні групи і раз на тиждень внутрішньочеревинно (в/ч) вводили їм IgG2a-контроль (антитіло проти gr120) у дозі 30 мг/кг, антитіло 37D3-H9 WT IgG2a проти тау-білка в дозі 3, 10 або 30 мг/кг, антитіло 37D3-H9 DANG IgG2a у дозі 3, 10 або 30 мг/кг. DANG відноситься до мутацій D265A/N297G в IgG2a, що порушують ефекторні функції. Всі розчини для введення антитіл одержували на основі 10 мМ гістидину (pH 5,8), 6 % сахарози, 0,02 % Tween 20 у концентрації 10 мг/мл. Лікування почали у віці 13 тижнів. Групи мишей у дослідженні *in vivo* містили самців, розподілених на 3 когорти. Крім того, тканини 3 мишей TauP301L-Tg збирали у віці 3 місяців, не піддаючи цих мишей лікуванню, з метою визначення вихідного рівня патології на момент початку лікування.

25

30

Для збору тканин мишей анестезували 2,5 % триброметанолом (0,5 мл на 25 г маси тіла) і виконували транскардіальну перфузію PBS. У тварин витягали головний мозок і розрізали його навпіл. Праві півкулі фіксували в 4 % параформальдегіді протягом ночі при 4 °C, а потім переносили у фізіологічний розчин з фосфатним буфером перед імуногістохімічною обробкою. Ліві півкулі додатково розрізали на льоді, а потім заморожували при -80 °C для біохімічного аналізу. У всіх мишей з хвостів зрізали шерсть для підтвердження генотипів.

35

40

Півкулі головного мозку багаторазово включали в желатиновий матрикс, використовуючи блоки MultiBrain® (NeuroScience Associates, Ноксвілл, штат Теннессі, США) й одержували корональні зрізи товщиною 25 мкм. У межах кожного блоку положення головного мозку рандомізували щодо генотипу та лікування. Вільно плаваючі зрізи півкуль головного мозку окремих мишей або блоків MultiBrain® офарблювали, як описано раніше (Le Pichon et al., 2013, PLoS One, 8(4): e62342), але з промиванням у PBS замість фізіологічного розчину з трис-буфером й інкубуванням основного антитіла при 4 °C замість кімнатної температури. Первинне антитіло являло собою антитіло кролика проти pTau212/214 (отримане власними силами; 0,01 мкг/мл). Щоб уникнути інтенсивного фарбування фона у випадку первинних антитіл миші, специфічних стосовно підтипу, автори винаходу використовували відповідне вторинне антитіло, специфічне стосовно даного підтипу (наприклад, біотинільоване антитіло проти IgG3 миші, Bethyl A90-111B).

50

Імунохімічно пофарбовані препарати візуалізували за допомогою системи сканування всього препарату Leica SCN400 (Leica Microsystems; Буффало-Гров, штат Іллінойс, США) при 200-кратному збільшенні з дозволом 0,5 мкм/піксель. Області, що представляли інтерес (ROI), відображали вручну на 4 відповідних рівнях гіпокампа на кожну тварину, і виконували автоматизовану кількісну оцінку фарбування на цих ROIs за допомогою двох кінцевих показників, описаних нижче. Всі види аналізу зображень виконували без урахування генотипу й експериментальної групи. Для аналізу областей позитивних пікселів з метою кількісного визначення ІГХ-офарбовування аналізували цифрові зображення ділянок мозку, мічених

55

60

антитілами, як описано раніше (Le Pichon et al., 2013). Відсоток пофарбованої області розраховували шляхом нормування загальної кількості позитивних пікселів до загальної області пікселів в ROI. Комплексну інтенсивність розраховували з використанням закону Бугера-Ламберта-Бера (поглинання = $-\log(\text{інтенсивність пропущеного світла}/\text{інтенсивність падаючого світла})$) тільки для площі позитивних пікселів.

Результати цього експерименту показані на Фігурі 14. Введення антитіла 37D3-H9 WT IgG2a проти тау-білка або антитіла 37D3-H9 DANG IgG2a проти тау-білка призвело до дозозалежного зниження рTau212/214 у гіпокампі.

Приклад 11: Варіанти 37D3-H9 з гуманізованою каппа-1 областю

Гуманізовані варіанти антитіла на основі hu37D3-H9.v1, що містять легкий каппа-1 ланцюг, одержали і перевірили на предмет стабільності N. Вирівнювання варіабельної області легкого ланцюга трьох протестованих варіантів з hu37D3-H9.v1 показане на Фігурі 18. Три варіанти відрізнялися один від одного за варіабельною областю легкого ланцюга: hu37D3.v39 містило мутацію F33L, hu37D3.v40 містило мутацію G29T, а hu37D3.v41 містило мутацію N30Q.

Зразки антитіл зазнавали термічної стресової обробки в такий спосіб. Зразки діалізували із заміною буфера на 20 mM ацетат гістидину, 240 mM сахарозу (pH 5,5) і розбавляли до концентрації 1 мг/мл. Один мл зразка піддавали стресовій обробці при 40 °C протягом 2 тижнів, а другий зберігали при -70 °C в якості контролю. Потім обидва зразки гідролізували з використанням трипсину для одержання пептидів, які можна було аналізувати з використанням рідинної хроматографії (PX) - мас-спектрометрії (МС). Для кожного пептиду зі зразка були отримані час утримання (за допомогою PX), а також точна маса з високим дозволом й інформація про іонну фрагментацію пептиду (інформація про амінокислотну послідовність) (за допомогою МС). Для пептидів, що представляють інтерес (нативних і модифікованих пептидних іонів), одержали хроматограми екстрагованих іонів (XIC) з наборів даних у вікні ± 10 м. Д.; піки інтегрували для визначення площі. Відносний відсоток модифікації розраховували для кожного зразка за формулою (площа модифікованого пептиду) розділити на (площа модифікованого пептиду плюс площа нативного пептиду) помножити на 100. Потім ці відносні процентні показники порівнювали в контрольному (t=0) та підданому стресу (t=2 тижня) зразках. Показані процентні показники відображали результат вирахування контрольного (t=0) значення зі значення після стресу (t=2 тижня). Результати представлені в таблиці 21. Результати продемонстрували, що мутація F33L ефективно знижувала дезамідування в гуманізованому легкому каппа-1 ланцюзі.

Таблиця 21

Стабільність варіантів hu37D3-H9.v1 у стрес-тестах щодо дезамідування

Антитіло		Посилення дезамінування N ²⁸ G ²⁹ N ³⁰ легкого ланцюга
hu37D3.v39	hlgG4.S228P.YTE	N ²⁸ :2,7 % N ³⁰ :Істотного посилення не виявлено
hu37D3.v40	hlgG4.S228P.YTE	N ²⁸ :12,1 % N ³⁰ :3,9 %
hu37D3.v41	hlgG4.S228P.YTE	N ²⁸ :6,0 % N ³⁰ :Залишок заміщений на глутамін

Спорідненість гуманізованого антитіла вимірювали при 25 °C за допомогою приладу Biacore T200, набору GE Biacore для захоплення FAb людини і чипа CM5 Series S. Антитіла розбавляли до 1 мкг/мл HBSP (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) і виконували захоплення при швидкості потоку 10 мкл/хв. протягом 180 секунд. Дані про кінетику збирали для мономера тау-білка людини, введеного в концентрації 1,2, 3,7, 11, 33 і 100 нМ в HBSP з використанням технології кінетики одиночного циклу при швидкості потоку 30 мкл/хв. Кожну концентрацію мономера тау-білка вводили на 3 хвилини, дисоціацію відслідковували протягом десяти хвилин. Між циклами поверхню регенерували з використанням двох послідовних хвилинних ін'єкцій 10 mM гліцину (pH 2,1). Дані апроксимували згідно з моделлю зв'язування 1:1 за допомогою програмного забезпечення BIAEvaluation. Кожне антитіло двічі проаналізували протягом експерименту; дані в таблиці 22 наведені у форматі середнє значення $\pm$ діапазон.

Таблиця 22

Спорідненість варіантів hu37D3:H9.v1 щодо мономерного тау-білка

	K _D (нМ)	k _{on} (1/Мс)	K _{off} (1/С)
hu37D3.v1 hlgG1	2,3±0,3	6±0,5×10 ⁵	1±0,1×10 ⁻³
hu37D3.v1 hlgG4	2,3±0,3	6±0,2×10 ⁻⁵	1±0,1×10 ⁻³
hu37D3.v39 hlgG4.YTE	1,9±0,2	6±0,6×10 ⁻⁵	1±0,02×10 ⁻³
hu37D3.v40 hlgG4.YTE	4,4±0,5	8±0,9×10 ⁻⁵	3±0,02×10 ⁻³
hu37D3.v41 hlgG4.YTE	5,4±0,3	9±1,2×10 ⁵	5±0,3×10 ⁻³

Приклад 12: Фармакокінетика та фармакодинаміка hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P і hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE в яванських макак

5 Для оцінки фармакокінетики і фармакодинаміки антитіл hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P і hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE in vivo п'яти яванських макак (*Macaca fascicularis*), що знаходяться у свідомості, на групу вводили однократну в/в болюсну ін'єкцію в дозі 50 мг/кг у першій фазі. В якості контролю використовували hlgG4 проти gD у такій самій дозі 50 мг/кг. У різні моменти часу аж до 35 днів після введення дози збирали зразки плазми і ЦСР з метою визначення концентрацій антитіл проти тау-білка.

10 Після останнього відбору проб тварин залишали відновлюватися протягом 63-64 днів до початку другої фази. У другій фазі 15 тварин після першої фази, а також 3 додаткових тварин розділили на дві групи; першій групі (n = 9) вводили антитіло hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P, а другій групі (n = 9) - антитіло hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE; дозування обох антитіл становило 50 мг/кг. Головний мозок 4 або 5 тварин у кожній групі збирали через 2 дня та 10 днів після введення.

15 Концентрацію антитіл IgG4 людини у плазмі, ЦСР і гомогенаті головного мозку яванського макака (описано нижче) вимірювали за допомогою твердофазного ІФА з використанням іммобілізованого антитіла вівці проти IgG людини з адсорбованим антитілом мавпи, з наступним додаванням зразків плазми, починаючи з розведення 1:100, зразків ЦСР, починаючи з розведення 1:20, або зразків гомогенату головного мозку, починаючи з розведення 1:10, і закінчуючи додаванням антитіла кози проти IgG людини з адсорбованим антитілом мавпи, кон'югованого з пероксидазою хрому, з метою виявлення. Фарбування розвивалося при використанні 3,3',5,5'-тетраметилбензидину та нейтралізовувалося при використанні 1 М фосфорної кислоти. Зразки зчитували при довжині хвилі 450/620 нм. Аналіз характеризувався каліброваною кривою у діапазоні 0,156-20 нг/мл і межею виявлення 0,02 мкг/мл для плазми, 0,003 мкг/мл для ЦСР і 0,002 мкг/мл для гомогенату головного мозку. Результати менше зазначеної концентрації реєстрували як "менше реєстрованого значення (LTR)".

20 Результати фармакокінетичного аналізу наведені на Фігурі 19А (плазма) та 19В (ЦСР) і в таблицях 23 і 24. Тварин з підозрою на наявність антитіл проти терапевтичного антитіла (АТА+) виключали з аналізу. Ці дані показують, що впровадження мутацій YTE в Fc-область hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P сповільнювало швидкість виведення антитіла з периферичної крові та ЦСР приблизно у два рази.

Таблиця 23

Розрахункові значення виведення з плазми і С_{макс} у вигляді "середнє значення (± СП)" після однократного болюсного в/в введення

Антитіло	Виведення з плазми (мл/доба/кг)	С _{макс} (мкг/мл)
Антитіло hlgG4 проти gD	1,67±0,415	1950±174
hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P	2,09±0,229	1970±144
hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE	1,12±0,233	1850±156

35

Таблиця 24

Розрахункові значення $C_{\text{макс}}$ у ЦСР у вигляді
"середнє значення ($\pm$ СП)" після однократного болюсного в/в введення

Антитіло	$C_{\text{макс}}$ (мкг/мл)
Антитіло hlgG4 проти gD	1,39 $\pm$ 0,751
hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P	0,910 $\pm$ 0,552
hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE	2,51 $\pm$ 1,93

Концентрації антитіл у головному мозку на 2 і 10 день після ін'єкції визначали в такий спосіб. Тканини головного мозку зважували і потім гомогенізували в 1 % NP-40 у фізіологічному розчині з фосфатним буфером, що містить таблетки суміші інгібіторів протеаз cOmplete™, Mini без ЕДТА. Потім гомогенізовані зразки головного мозку струшували при 4 °C протягом 1 години перед центрифугуванням при 14000 об./хв. протягом 20 хвилин. Надосадову рідину відокремлювали для вимірювання концентрації антитіла в головному мозку за допомогою твердофазного ІФА, як описано вище. Результати цього експерименту наведені на Фігурах 21A-D. Концентрація антитіла hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE у головному мозку та співвідношення концентрацій антитіла hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE у головному мозку та плазмі були вище, ніж для антитіла hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.

Крім того, визначали фармакодинамічну відповідь у плазмі. Концентрацію загального тау-білка у плазмі з K_2 ЕДТА визначали за допомогою електрохемілюмінесцентного (ЕСЛ) імуноаналізу (Roche Professional Diagnostics (RPD), Пенцберг, Німеччина). Імуноаналіз Elecsys® пройшов валідацію для кількісного визначення загального тау-білка в ЦСР людини, і через подібність між тау-білком людини й яванського макака вважався прийнятним для вимірювання тау-білка яванського макака в ЦСР і плазмі. Даний аналіз дозволяв захоплювати і визначати амінокислоти 159-224 тау-білка людини й яванського макака (ця область присутня у всіх відомих ізоформах, незалежно від стану фосфорилювання). Нижня межа виявлення (НМВ) даного аналізу становила 1,01 пг/мл. Аналіз допускає присутність до 15,0 мг/мл hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE.

Результати фармакодинамічного аналізу наведені на Фігурі 20. Після виключення тварин з підозрою на АТА+ і ще однієї тварини без вихідних значень кожна група містила 3 тварин. Як не дивно, у перший день введення рівень тау-білка у плазмі більшою мірою підвищувався у тварин, що одержували варіант YTE у порівнянні з варіантом без YTE. Крім того, цей результат не піддавався прогнозуванню на підставі фармакокінетичної відповіді (фігура 20), оскільки ФК була аналогічна між цими варіантами в ранні моменти часу. Більше надійна відповідь підтримувалася у тварин, що одержували варіант YTE протягом усього періоду пробовідбору.

Приклад 13: Фармакокінетика та фармакодинаміка hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE у головному мозку яванських макак

Для оцінки фармакокінетики антитіла у головному мозку дванадцяти яванських макак (Macaca fascicularis), що знаходяться у свідомості, на групу вводили однократну в/в болюсну ін'єкцію hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE у дозі 50 мг/кг. В якості контролю використовували hlgG4 проти gD у такій самій дозі 50 мг/кг. У різні моменти часу аж до 42 днів після введення дози збирали зразки плазми з метою визначення концентрацій антитіла проти тау-білка. Крім того, у різний час аж до 42 днів умертвили 2 мавп і визначили концентрації антитіла в головному мозку та ЦСР. Концентрацію антитіла в основному визначали, як описано у прикладі 12.

На Фігурі 22A-B показана концентрація антитіла у головному мозку яванського макака в різні моменти часу після введення, представлена на графіку з логарифмічною (А) та лінійною (В) шкалою. У таблиці 25 показані параметри концентрації у головному мозку.

Таблиця 25

Розрахункові значення ФК-параметрів у головному мозку у вигляді
"середнє значення ($\pm$ СП)" після однократного болюсного в/в введення

Група	$C_{\text{макс}}$ (мкг/мл)	ППКall (доба*мкг/мл)
Антитіло hlgG4 проти gD	0,175 $\pm$ 0,02	4,26 $\pm$ 0,35
hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE	0,12 $\pm$ 0,03	3,88 $\pm$ 0,89

Антитіло hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE продемонструвало збільшення концентрації у головному мозку в кінцевий момент часу у порівнянні з антитілом проти gD.

Крім того, визначили концентрацію антитіл в різних областях головного мозку, включаючи гіпокамп, мозочок і лобову кору. Результати даного аналізу представлені на Фігурі 23А-С і в таблицях 26-28.

Таблиця 26

Розрахункові середні значення ФК-параметрів
у гіпокампі після однократного болюсного в/в введення

Група	Смакс (мкг/мл)	ППКall (доба*мкг/мл)
Антитіло hlgG4 проти gD hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE	0,159 0,087	3,95 2,87

Таблиця 27

Розрахункові середні значення ФК-параметрів у мозочку
після однократного болюсного в/в введення

Група	Смакс (мкг/мл)	ППКall (доба*мкг/мл)
Антитіло hlgG4 проти gD hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE	0,196 0,139	4,30 4,56

Таблиця 28

Розрахункові середні значення ФК-параметрів
у фронтальній корі після однократного болюсного в/в введення

Група	Смакс (мкг/мл)	ППКall (доба*мкг/мл)
Антитіло hlgG4 проти gD hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE	0,17 0,138	4,65 4,22

Результати цього експерименту продемонстрували вплив антитіла hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE у різних областях головного мозку після однократної в/в ін'єкції. Загальний вплив у головному мозку було порівнянний у двох даних групах, однак аналогічно спостереженням у плазмі, спостерігали дворазове збільшення концентрації антитіл у головному мозку в останній момент часу у тварин, що одержували антитіло hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE, у порівнянні з антитілом проти gD. Див. Фігуру 23. Ці результати вказують на підтримку (термінальних) концентрацій вище мінімуму в головному мозку після введення антитіла YTE.

Крім того, визначали концентрацію антитіл у ЦСР і плазмі з плином часу.

Результати даного аналізу представлені на Фігурах 23D (ЦСР) і 23E (плазма) і в таблицях 29 і 30.

Таблиця 29

Розрахункові середні значення ФК-параметрів у ЦСР після однократного болюсного в/в введення

Група	Смакс (мкг/мл)	ППКall (доба*мкг/мл)
Антитіло hlgG4 проти gD hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE	1,270 3,980	18,400 21,100

Розрахункові середні значення ФК-параметрів у плазмі після однократного болюсного в/в введення

Група	Смакс (мкг/мл)	Тмакс День	ППКall (доба* мкг/мл)	Закінчення експерименту (день 43) мкг/мл
Антитіло hlgG4 проти gD	0,175±0,02	2	4,26±0,35	36,3±14,1
hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE	0,12±0,03	3	3,88±0,89	89,4±42,3

Аналогічно фармакокінетиці у плазмі та головному мозку, в останній момент часу у тварин, що одержували антитіло hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE, у порівнянні з антитілом проти gD мало місце дворазове збільшення концентрації антитіла в ЦСР. Див. Фігуру 23.

Оцінку фармакодинаміки антитіла hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE і контрольного антитіла у плазмі після однократного в/в введення в дозі 50 мг/кг виконали, використовуючи зібрані зразки плазми яванських макак. Кількісну оцінку рівня тау-білка у плазмі виконали за допомогою імуноаналізу Elecsys®, що обговорювався у прикладі 12.

Результати фармакодинамічного аналізу наведені на Фігурі 24А-В. На Фігурі 24А показана середня концентрація загального тау-білка у плазмі, нормована за вихідним рівнем. На Фігурі 24В показана концентрація загального тау-білка у плазмі окремих мавп, використаних у даному дослідженні, нормована за вихідним рівнем.

Аналогічно результатам, отриманим у прикладі 12, введення антитіла hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE призвело до значного підвищення рівня тау-білка у плазмі. Безвідносно до яких-небудь конкретних теоретичних представлень, ці дані показують, що hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE зв'язується з тау-білком у головному мозку, і, отже, відбувається виведення тау-білка з головного мозку на периферію. Ці результати узгоджуються з впливом hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE на мішені у головному мозку.

Приклад 14: Дозрівання спорідненості антитіла hu37D3.v28.A4

Дозрівання спорідненості 37D3.v28.A4 здійснювали за допомогою глибокого секвенування бібліотеки скануючого мутагенезу. Було розроблено дві бібліотеки, по одній для кожного ланцюга антитіла, в яких вибрані положення у варіабельних областях важкого або легкого ланцюга рандомізували з NNK (код згідно з IUPAC) кодоном, який кодує будь-яку амінокислоту або амбер стоп-кодон. Розробка дозволяє забезпечувати лише одну зміну амінокислоти у варіабельних областях антитіла на клон. Положення вибирали з CDR і положень каркасу у безпосередньому контакті або біля CDR. Положення легкого ланцюга за Kabat 1-5, 24-27, 29-36, 38, 43, 44, 46-58, 60, 63-71, 87 і 89-97 і положення важкого ланцюга за Kabat 1, 2, 4, 24-39, 43, 45-81, 82a, 82b, 83, 85, 86, 91 і 93-103 рандомізували з NNK-кодонами. Клони легкого ланцюга, які не рандомізували положення 28, мали Ser у положенні 28 замість Asp дикого типу. Два різних фрагмента ДНК використовували для рандомізації положення 28 легкого ланцюга. Один клон мав кодон VNK, а інший - кодон NYK, що уможливило будь-яку амінокислоту за винятком Tyr, Cys, Trp і стоп-кодонів. Бібліотеки створювали шляхом синтезу ДНК (GeneWiz), одержуючи 60 незалежних фрагментів лінійної ДНК для легкого ланцюга та 75 для важкого ланцюга, при цьому одне положення у кожному фрагменті було рандомізоване з NNK-кодом або сумішшю VNK/NYK. Фрагменти лінійної ДНК об'єднували для кожного ланцюга та клонували у вектор фагового дисплею моновалентного Fab-фрагмента (див. Lee CV et al., J. Immunol. Methods 284:119-132 (2004)). Клони з бібліотеки легкого ланцюга мали варіабельну область важкого ланцюга дикого типу, тоді як клони з бібліотеки важкого ланцюга мали варіабельну область легкого ланцюга з мутацією N28S. Продукти лігування електропорували в Escherichia coli XL-1, суперінфікували хелперним фагом M13 KO7 (New England Biolabs) і зрощували, як описано (див. Koenig P et al., J. Biol. Chem. 290:21773-21786 (2015)).

Здійснювали три послідовні кола сортування, використовуючи мономер тау-білка, що адсорбований на планшеті ELISA (Коло 1), або розчин біотинільованого на N-кінці пептиду, що включає залишки 2-24 (біотин-ПЕГ-AEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRK; SEQ ID NO: 624) тау-білка людини (Коло 2 і 3). У першому колі фаг (1 OD₂₆₈/мл) інкубували у планшеті ELISA, покритому тау-білком, протягом 2 годин при температурі навколишнього середовища. У другому та третьому колах фаг (5 OD₂₆₈/мл) інкубували зі 100 нМ біотинільованого пептиду тау-білка протягом 2 годин при температурі навколишнього середовища, потім розбавляли уп'ятеро та захоплювали на планшетах ELISA, покритих нейтравідином (Pierce), протягом 10 хвилин.

Жорсткі умови реакції посилювали на Колі 3 шляхом інкубування лунок, що містять захоплений фаг із буфером зв'язування (ФСБ, 0,5 % альбуміну бичачої сироватки) протягом додаткових 20 хвилин після захоплення фагу та промивання. Етап промивання потім повторювали. Фаг потім вимивали з планшетів ELISA шляхом інкубування з 0,1 М хлористо-водневої кислоти і в ньому розповсюджували інфекцію *Escherichia coli* з подальшим суперінфікуванням хелперним фагом M13K.O7 (New England Biolabs). Для полегшення аналізу шляхом секвенування наступного покоління, у Колі 3 здійснювали "імітаційну" селекцію паралельно із селекцією, що тільки-но була описана. "Імітаційну" селекцію, призначену для забезпечення негативного контролю або еталонного зразка, здійснювали з використанням того ж способу, що і тільки-но був описаний у Колі 3, але без додавання біотинільованого пептиду.

Початкові результати одержували за допомогою секвенування індивідуальних колоній за Сенгером.

На додаток, плазмідну ДНК екстрагували з популяцій *Escherichia coli* XL-1, використаних для фагової ампліфікації. Інсерції ампліфікували за допомогою ПЛР-ампліфікації у 18 циклів з використанням ДНК-полімерази Phusion (New England Biolabs) з подальшим очищенням ампліконів арагозним гелем. Амплікони секвенували за допомогою секвенування Illumina, як описано раніше (Koenig P., et al. (2015). J. Biol. Chem. 290, 21773-21786). Послідовності фільтрували з використанням послідовностей праймерів для ПЛР і шляхом видалення послідовностей, які були більше довгими або більше короткими, ніж батьківська послідовність, або містили більше ніж одну кодуєчу мутацію у варіабельній області. Коефіцієнти збагачення обчислювали шляхом розділення частоти заданої мутації у заданому положенні в одній популяції на частоту точно такої ж мутації у другій популяції. Популяції називали, використовуючи наступні аббревіатури:

R0 - Несортована бібліотека

R2 - Фаг із селекції у Колі 2 з використанням 100 нМ біотинільованого пептиду

R3 - Фаг із селекції у Колі 3 з використанням 100 нМ біотинільованого пептиду

R3M - Фаг із "імітаційної" селекції у Колі 3.

Вибрані мутації переносили окремо або в комбінації на варіабельні домени hu37D3.v28.A4, що синтезовані та клоновані у вектор експресії IgG-клітини ссавця. У деяких випадках вибрані мутації переносили на варіабельні домени, які були гуманізовані іншим чином у порівнянні з hu37D3.v28.A4. Приклади альтернативно гуманізованих антитіл, що містять мутації, які ідентифіковані процедурами фагового дисплею, що описані вище, включають hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 і hu37D3-H9.v93.

Плазміди важкого ланцюга та легкого ланцюга експресували у клітинах Expi293 шляхом транзійентної інфекції й IgG, що очищений від супернатантів із використанням хроматографії спорідненості за допомогою смоли MabSelect SuRe (GE Life Sciences). Очищений IgG аналізували на зв'язування з мономером тау-білка людини з використанням поверхневого плазмонного резонансу. Стисло, використовували інструмент Biacore T200 для захоплення антитіл на чипі для захоплення IgG людини, який був згенерований з використанням сенсорного чипу Series S CM5, і набір для захоплення IgG людини (GE Life Sciences). Захоплені антитіла піддавали впливу мономеру тау-білка людини у розчині та здійснювали моніторинг фаз асоціації та дисоціації. Споріднення обчислювали шляхом підгонки моделі зв'язування 1:1 до кінетичних даних з використанням програмного забезпечення Biacore Evaluation.

Порівняння варіабельних областей важкого та легкого ланцюга для hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 і hu37D3-H9.v93 з батьківським hu37D3-H9.v28.A4 показане на Фігурах 25A-B. Чорним затіненням позначені амінокислоти, якими відрізняються антитіло з дозрілою спорідненістю та батьківське антитіло.

Антитіла hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 і hu37D3-H9.v93 із дозрілою спорідненістю оцінювали на їх моновалентну взаємодію з мономером рекомбінантного тау-білка людини й яванського макака.

Спорідненість для тау-білка людини й яванського макака вимірювали при 37 °C за допомогою інструмента Biacore T200, набору для захоплення IgG людини GE Biacore та сенсорного чипу Series S CM5. Антитіла розбавляли до 1 мкг/мл у рухомому буфері HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 % Tween 20) і захоплювали при витраті потоку 10 мкл/хв. протягом 15 секунд. Збирали дані щодо зв'язування мономеру тау-білка людини й яванського макака, кожний з яких вводили при 0, 0,1, 0,4, 1,2, 3,7, 11,1 і 33,3 нМ, використовуючи витрату потоку 30 мкл/хв. час контакту 300 с і час дисоціації 900 с. Між циклами поверхню регенерували за допомогою 3М хлориду магнію. Дані підгоняли під модель зв'язування 1:1 з використанням програмного забезпечення BIAEvaluation.

- На Фігурі 26А представлені дані про спорідненість для антитіла hu37D3-H9.v76 для мономеру тау-білка людини, причому кожна крива являє собою іншу концентрацію антитіла. На Фігурі 26В представлені ці дані для мономеру тау-білка яванського макака (супо). Кожне зі споріднено-очищених антитіл hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 і hu37D3-H9.v93 мало K_D 0,1 нМ при 37 °С для мономерів тау-білка як людини, так й яванського макака, як показано в Таблиці 31. У паралельних експериментах батьківське антитіло hu37D3-H9.v28.A4 мало K_D 5-8 нМ (дані не показані).

Таблица 31

Вимірювання спорідненості антитіл hu37D3 із дозрілою спорідненістю

	Мономер тау-білка людини			Мономер тау-білка яванського макака		
	KD (нМ)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)	ka (1/Мс)	kd (1/с)
hu37D3-H9.v76	0,1	6,94X10 ⁶	8,92X10 ⁻⁴	0,1	9,27X10 ⁶	1,14X10 ⁻³
hu37D3-H9.v83	0,1	6,19X10 ⁶	8,18X10 ⁻⁴	0,1	9,55X10 ⁶	1,14X10 ⁻³
hu37D3-H9.v93	0,1	6,89X10 ⁶	1,02X10 ⁻³	0,1	1,29X10 ⁷	1,78X10 ⁻³

- Хоча даний винахід докладно описаний за допомогою ілюстрації та прикладу для ясності розуміння, не слід вважати, що опис і приклади обмежують рамки винаходу. Описи всіх патентів і наукової літератури, наведені у даному документі, явно повністю включені у даний документ за допомогою посилання.

Таблица последовательностей

SEQ ID NO	Опис	Послідовність
2	Епітоп тау-білка людини (2-24)	AEPRQEFQFVDMEDHAGTYGLGDRK
4	Епітоп тау-білка яванського макака (2-24)	AEPRQEFQFVDMEDHAGTYGLGDRK
10	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 37D3-H9	EVQLVESGGD LAKPGGSLKL SCTASGLIFR SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT INSGGTYTYT PDSVKGRFTI SRDRAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCANSY SGAMDYWGQG TSVTVSS
11	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 37D3-H9	EDLLTQTFLS LPVSLGDPAS ESCRSSQSIV HNGNTYFEW YLQKPGQSPK LLIYKVSRRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSLLP WTEGGGTKLE IK
12	HVR-H1 37D3-H9	SYGMS
13	HVR-H2 37D3-H9	TINSGGTYTYTPDSVKG
14	HVR-H3 37D3-H9	SYSGAMDY
15	HVR-L1 37D3-H9	RSSQSIVRSGNTYFE
16	HVR-L2 37D3-H9	KVENRFS
17	HVR-L3 37D3-H9	FQGSLLPWT
20	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 37D3-H9b	EVQLVESGGD LAKPGGSLKL SCTASGLIFR SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT INSGGTYTYT PDSVKGRFTI SRDRAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCANSY SGAMDYWGQG TSVTVSS
21	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 37D3-H9b	EDLLTQTFLS LPVSLGDPAS ESCRSSQSIV HNGNTYFEW YLQKPGQSPK LLIYKVSRRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSLLP WTEGGGTKLE IK
22	HVR-H1 37D3-H9b	SYGMS
23	HVR-H2 37D3-H9b	TINSGGTYTYTPDSVKG
24	HVR-H3 37D3-H9b	SYSGAMDY

25	HVR-L1 37D3-H9b	RSSQSIVHSNGNTYPE	
26	HVR-L2 37D3-H9b	KVSNRFS	
27	HVR-L3 37D3-H9b	FQGSIVPWT	
30	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 11E10-B8	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFR SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT ISSGGSYTTY PDSVRGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCAVSY DGAMDYWGQG TSVTVSS	
31	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 11E10-B8	DVLTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGL YYCFQGSHVP WTFGGGTKLE IK	
32	HVR-H1 11E10-B8	SYGMS	
33	HVR-H2 11E10-B8	TISSGGGSYTYYPDSVKG	
34	HVR-H3 11E10-B8	SYDGAMDY	
35	HVR-L1 11E10-B8	RSSQSIVHSNGNTYPE	
36	HVR-L2 11E10-B8	KVSNRFS	
37	HVR-L3 11E10-B8	FQGSIVPWT	
40	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 54C1-H11 i 61E7-C4	EVQLVESGGD LVKPGGSLKV SCVASGFTFR SYGMSWVRQT PDKRLDWVAT ISSGGNYTTY PDSVKGFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCASSY SGAMDYWGQG TSVTVSS	
41	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 54C1-H11 i 61E7-C4	DTVMTQSPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYTVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP WTFGGGTKLE IK	
42	HVR-H1 54C1-H11 i 61E7-C4	SYGMS	
43	HVR-H2 54C1-H11 i 61E7-C4	TISSGGNYTYYPDSVKG	
44	HVR-H3 54C1-H11 i 61E7-C4	SYSGAMDY	
45	HVR-L1 54C1-H11 i 61E7-C4	RSSQSIVHSNGNTYPE	
46	HVR-L2 54C1-H11 i 61E7-C4	TVSNRFS	
47	HVR-L3 54C1-H11 i 61E7-C4	FQGSIVPWT	
50	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 3A4-H4	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT ISSGGTYTTY PDSVKGFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYFCATSY DGAMDYWGQG TSVTVSS	
51	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 3A4-H4	DVLTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGTLP WTFGGGTKLE IK	
52	HVR-H1 3A4-H4	SYGMS	
53	HVR-H2 3A4-H4	TISSGGTYTYYPDSVKG	
54	HVR-H3 3A4-H4	SYDGAMDY	
55	HVR-L1 3A4-H4	RSSQIVHSNGNTYPE	
56	HVR-L2 3A4-H4	KVSNRFS	
57	HVR-L3 3A4-H4	FQGTLPWT	
60	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 19H6-F7	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT ISSGGTYTTY PDSVKGFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCAPSY DGAMDYWGQG TSVTVSS	

61	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 19H6-F7	DVLMTQTPLS HSNGNTYLEW SGVPDFRFGS YYCFQGS LVP WTEGGGTRLE IK	LPVSLGDQAS YLQKPGQSPK GSGTDFTLKI	ISCRSSQSTV LLIYKVS NRF SRVEAEDLGV
62	HVR-H1 19H6-F7	SYGMS		
63	HVR-H2 19H6-F7	TISSGGTYTYYPDSVKG		
64	HVR-H3 19H6-F7	SYDGAMDY		
65	HVR-L1 19H6-F7	RCSQSIVHSNGNTYLE		
66	HVR-L2 19H6-F7	KVSNRFS		
67	HVR-L3 19H6-F7	FQGS LVPWT		
70	Варіабельна область важкого ланцюга (VH)94B2-C1	EVQLQQSGPE GYTMNWVKQS NQRFKGKATL SAVYYCARQG AYWEQGT LVT VSA	LVRPGASMKI HGKNLEWIGL TVDKSSNTAY	SCRASGYSLT ISPYNGVTSY MELLSLTFED
71	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 94B2-C1	DVVMTQTPLT DSDCKTYLW SGVPDFRFTGS YYCWQGT HFF WTEGGGTRLE IK	LSVTIGQPAS LLQRPQGSPK GSGTDFTLKI	ISCKSSQSLL RLIYLVSKLD SRVEAEDLGV
72	HVR-H1 94B2-C1	GYTMN		
73	HVR-H2 94B2-C1	LISPYNGVTSYNQKFKG		
74	HVR-H3 94B2-C1	QGAY		
75	HVR-L1 94B2-C1	KSSQSLLDSDGKTYLN		
76	HVR-L2 94B2-C1	LVSKLDS		
77	HVR-L3 94B2-C1	WQGT HFPWT		
80	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 125B11-H3	EVKLEESGCG NYWMNWVRQS HYAESVKG RF EDTGIIYCTG GTTYWQGGTT LTVSS	LVQPGGSMKL PERGLEWVAQ TISRDSKSS	SCVASRFIFS IRLKSDNYAT VYLQMNNLRA
81	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 125B11-H3	DIVMTQSQKF TAVAWYQQKP RFTGNGSGTD FRTYPYTFEGG GTKLEIK	LSTSVGDRVN GQSPGLLIYS FTLTISDMQS	ITCKASQNVG ASIRYTGVPD EDLADYFCQQ
82	HVR-H1 125B11-H3	NYWMN		
83	HVR-H2 125B11-H3	QIRLKSDNYA THYAESVKG		
84	HVR-H3 125B11-H3	GTTY		
85	HVR-L1 125B11-H3	KASQNVGTAVA		
86	HVR-L2 125B11-H3	SASIRYT		
87	HVR-L3 125B11-H3	QQFRTYPYT		
90	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 113F5-F7	EVKLEESGEG NYWMNWIRQS HYAESVKG RF EDTGIIYCTG GTSYWQGGTT LTVSS	LVQPGGSMRL PERGLEWVAQ TISRDA SNFS	SCVASEFTFS IFLKSDNYAT VYLQMNNLRA
91	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 113F5-F7	DIVMTQSQKI TAVAWYQQR F RFTGSGSGTD FSTYPYTFEGV GTKLEIK	MSTSVGDRVS GHSPELLIYS FTLTILNVQS	ITCKASQNVG ASRRFSGVPD EDLADYFCQQ
92	HVR-H1 113F5-F7	NYWMN		
93	HVR-H2 113F5-F7	QIRLKSDNYATHYAESVKG		
94	HVR-H3 113F5-F7	GTSY		
95	HVR-L1 113F5-F7	KASQNVGTAVA		
96	HVR-L2 113F5-F7	SASRRFS		
97	HVR-L3 113F5-F7	QQFSTYPYT		
100	Варіабельна область важкого ланцюга (VH)26C1-B11	EVNLCQSGAE DYMYWVKQR FPKFGGKATM TAVYYCNAWR ARATNSALDY WGGGTSVTVS S	LVRSGASVRL PEQGLEWIGW TADTSSKTAY	SCTASGFNIH IDPENGDT EY LQLSSLTISED

101	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 26C1-B11	DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLRRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTTHFF WTFGGGTKLE IK
102	HVR-H1 26C1-B11	DYYMY
103	HVR-H2 26C1-B11	WIDPENGDT E YFPKFQ
104	HVR-H3 26C1-B11	WRARATNSAL DY
105	HVR-L1 26C1-B11	KSSQSLLDSD GKTYLN
106	HVR-L2 26C1-B11	LVSKLDS
107	HVR-L3 26C1-B11	WQGTTHFPWT
ПО	Варіабельна область важкого ланцюга (VH)26C1-C8	EVHLQQSGAE LVRPGASVKL SCTASGCFNIK DYYMYWVKQR PEQGLEWIGW IDPENGDT EY FPPFQGGKATM TADTSSKTAY LQLSSLTSED TAVYYCNAWR ARATNSALDY WGQGTSTVTS S
111	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 26C1-C8	DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLRRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTTHFF WTFGGGTKLE IK
112	HVR-H1 26C1-C8	DYYMY
113	HVR-H2 26C1-C8	WIDPENGDT E YFPKFQ
114	HVR-H3 26C1-C8	WRARATNSAL DY
115	HVR-L1 26C1-C8	KSSQSLLDSD GKTYLN
116	HVR-L2 26C1-C8	LVSKLDS
117	HVR-L3 26C1-C8	WQGTTHFPWT
120	Варіабельна область важкого ланцюга (VH)30G1-B2	QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFI DYEMYNWVKQT PVHGLEWIGA IDPETGDTAY NQRKFKGKATL TADKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCIRQY GNWFPYWGQG TLVTVSA
121	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 30G1-B2	DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCKSSQSLL HANGNTYLNW FLQKFGLSPK LLIYKVSNNF SGVPDRFSGG GSGTDFTLKI TRLEAEDLGV YFCSQSSTHVP FTFGGGTKLE IK
122	HVR-H1 30G1-B2	DYEMY
123	HVR-H2 30G1-B2	AIDPETGDTAYNQRKFKG
124	HVR-H3 30G1-B2	QYGNWFPY
125	HVR-L1 30G1-B2	RSSQSLLVHANGNTYLN
126	HVR-L2 30G1-B2	KVSNRPS
127	HVR-L3 30G1-B2	SQSTRVPFT
130	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 66F5-A1	QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFI DYEMNNWVKQT PVHGLEWIGA IDPENGDTAY NQRKFKGRAIV TADKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCQGPV FDYWGQSTTL TVSS
131	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 66F5-A1	DIIVMTQSPSS LAMSVGQKVT MSCKSSQSLL NSSTQKNYLA WYQQKFGQSP KLLVYFASTR ESGVPRDFIC GSGTDFTLT ISSVQAEDLA DYFCQQHYST PYTFGGGTKL EIK
132	HVR-H1 66F5-A1	DYEMN
133	HVR-H2 66F5-A1	AIDPENGDTA YNQRKFKG
134	HVR-H3 66F5-A1	PRFDY
135	HVR-L1 66F5-A1	KSSQSLLNSS TQKNYLA
136	HVR-L2 66F5-A1	FASTRES
137	HVR-L3 66F5-A1	QQHYSTPYT

140	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 123E9-A1	EVQLQQSGPE DYIMKWVKQS NQRKFKGKATL SAVYYCARSR	LVKPGASVMM HGKSLEWIGD TVDKSSSTAY GYGDSFAYWG	SCKASGYTFT IDPNNGGTSY MQLNSLTSED QGTILVTVSA
141	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 123E9-A1	DVLMTQTPLS HSNGNTYLEW SGVPDRFSGS YYCFQGSHVP	LPVSLGDQAS YLQKPGQSPK GSGTDFTLKI PTFGGGTKLE IK	ISCRSSQNTV LLIYKVSNNR SRVEAEDLGE
142	HVR-H1 123E9-A1	DYIMK		
143	HVR-H2 123E9-A1	DLDPNNGGTSYNQRKFKG		
144	HVR-H3 123E9-A1	SAGYGDSPAY		
145	HVR-L1 123E9-A1	RSSQNTIVHSN GNTYLE		
146	HVR-L2 123E9-A1	KVSNRRFS		
147	HVR-L3 123E9-A1	FQGSHVPPT		
150	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 15C6-A7	EVQLQQSGPE DYIMKWVKQS NQRKFKGKATL SAVYYCARSR	LVKPGASVMM HGKSLEWIGD TVDKSSSTAY GYGDSFAYWG	SCKASGYTFT LDPYTGGSANY MHLNSLTSED QGTILVTVSA
151	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 15C6-A7	DVLMTQTPLS HSNGNTYLEW SGVPDRFSGS YFCFQGSHVP	LPVSLGDQAS YLQKPGQSPK GSGTDFTLKI PTFGGGTKLE IK	ISCRSSQNTV LLIYKVSNNR SRVEAEDLGE
152	HVR-H1 15C6-A7	DYIMK		
153	HVR-H2 15C6-A7	DLDPYTGGSANYNQRKFKG		
154	HVR-H3 15C6-A7	SRGYGDSPAY		
155	HVR-L1 15C6-A7	RSSQNTIVHSN GNTYLE		
156	HVR-L2 15C6-A7	KVSNRRFS		
157	HVR-L3 15C6-A7	FQGSHVPPT		
160	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 19F8-B1	EVQLQQSGPE DYIMKWVKQS NQRKFKGQATL SAVYYCARSR	LVKPGASVMM HGKSLEWIGD TVDKSSSTAY GYGDSFAYWG	SCKASGYTFT LNPNNGGTLY MQFNLSLTSED QGTILVTVSA
161	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 19F8-B1	DVLMTQTPLS HSNGNTYLEW SGVPDRFSGS YFCFQGSHVP	LPVSLGDQAS YLQKPGQSPK GSGTDFTLKI PTFGGGTKLE IK	ISCRSSQNTV LLIYKVSNNR SRVEAEDLGE
162	HVR-H1 19F8-B1	DYIMK		
163	HVR-H2 19F8-B1	DLNPNNGGTL YNQRKFKG		
164	HVR-H3 19F8-B1	SAGYGDSPAY		
165	HVR-L1 19F8-B1	RSSQNTIVHSN GNTYLE		
166	HVR-L2 19F8-B1	KVSNRRFS		
167	HVR-L3 19F8-B1	FQGSHVPPT		
170	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 24A11-D5	EVQLQQSGPE DYIMKWVKQS NQRKFKGQATL SAVFYCARSG	LVKPGASVMM HGKSLEWIGD TVDKSSSTAY GYGDSFAYWG	SCKASGYTFT LNPKNGGIIY MQLNSLTSED QGTILVTVSA
171	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 24A11-D5	DVLMTQTPLS HSNGNTYLEW SGVPDRFSGS YFCFQGSHVP	LPVSLGDQAS YLQKPGQSPK GSGTDFTLKI PTFGGGTKLE IK	ISCRSSQNTV LLIYKVSNNR SRVEAEDLGE
172	HVR-H1 24A11-D5	DYIMK		
173	HVR-H2 24A11-D5	DLNPKNCGII YNQRKFKG		
174	HVR-H3 24A11-D5	SGGYGDSPAY		
175	HVR-L1 24A11-D5	RSSQNTIVHSN GNTYLE		

176	HVR-L2 24A11-D5	KVSNRFS		
177	HVR-L3 24A11-D5	FQGSHPPT		
180	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 126F11-G11	EVQLQSSGAE DDYMHVVKQR ASKEQCKATI TAVYYCLDEA	LVRPGASVKL PEQCLEWIGW TTDTSSNTAY YGYWGGQTTL	SCTASGPNIK IDPENGDTKY LQLSSLTSED
181	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 126F11-G11	DVLTQTPLS HNGNTYLEW SGVPDRFSGS YYCFQGSHP	LPVSLGDAQS YLQKPGQSPK GSGTDFTLKI PAFGGGTKLE	ISCRSSQSLV LLIYKVSNNF SRVEAEDLGV IK
182	HVR-H1 126F11-G11	DDYMH		
183	HVR-H2 126F11-G11	WIDPENGDTY	YASKEQCK	
184	HVR-H3 126F11-G11	FAYGY		
185	HVR-L1 126F11-G11	RSSQSIHNSN	GNTYLE	
186	HVR-L2 126F11-G11	KVSNRFS		
187	HVR-L3 126F11-G11	FQGSHPFA		
190	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 89F4-A1	EVQLVESGGG TYAMNWVRQA YFADSVKDRF EDTAMYYCVS	LVQPGSSSLKL PGKGLEWVAF TISRDDSQTM GGNYVPFAYW	SCAASGFTFN IRSKSNNYAA LYLQMNNLKS GGGTLLVTVSA
191	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 89F4-A1	NIMMTQSPSS YSSEQRNYLA ESGVPDRFTG VYYCHQYLSS	LAVSAGEKVT WYQKPGQSP GSGTDFTLT FTFGSGTKLE	MSCKSSQSVF KLLISWASTR ISSVQGEDLA IK
192	HVR-H1 89F4-A1	TYAMN		
193	HVR-H2 89F4-A1	RIRSKSNNYA	AYFADSVND	
194	HVR-H3 89F4-A1	GGNYVPFAY		
195	HVR-L1 89F4-A1	KSSQSVFYSS	EQRNYLA	
196	HVR-L2 89F4-A1	WASTRES		
197	HVR-L3 89F4-A1	HQYLSSFT		
200	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 93A8-D2	EVQLQSSGFV DYYVNWVKQS NQNFNDKATL SAVYYCTREG	LVKPGASVKM HCKGLEWIGL TVDKSSSTAF GTGYWGGQTT	SCKASGYTFN INPNNGRTSY MDLNSLTSED LSVSS
201	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 93A8-D2	DVMTQTPLT DSDGKTYLNW SGVPDRFTGS YYCWQCTHFP	LSVTIGQFAS LLQKPGQSPR GSGTDFTLKI RTFGGGTKLE	ISCKSSQSLV RLIYLVSKLD SRVAEEDLGV IK
202	HVR-H1 93A8-D2	DYYVN		
203	HVR-H2 93A8-D2	LINPNNGRTSY	NQNFND	
204	HVR-H3 93A8-D2	EGGTGY		
205	HVR-L1 93A8-D2	KSSQELLDS	DGKTYLN	
206	HVR-L2 93A8-D2	LVSKLDS		
207	HVR-L3 93A8-D2	WQGTTHFPRT		
210	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 14F5-D9	EVKLVESGGG DFYMEWVRQS EYNASVKDRF EDTAIYYCAR	LVQPGGSLRL PGKRLEWIAA FVSRDTSQSI DALGTVFAYW	SCATSGFTFN SKNKANDYTT LYLQMNALRA GGGTLLVTVSA
211	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 14F5-D9	DVMTQTPLS RSNGNTYLHW SGVPDRFSGS YFCSQSTLYP	LPVSLGDAQS YLQKPGQSPK GSGTDFTLKI LTFGAGTKLE	ISCRSSQSLV LLIYKVSNNF SRVEAEDLGV LK
212	HVR-H1 14F5-D9	DFYME		
213	HVR-H2 14F5-D9	ASKNKANDYT	TEYNASVKD	
214	HVR-H3 14F5-D9	DALGTVFAY		

215	HVR-L1 14F5-D9	R3SQSLVH3N GNTYLH		
216	HVR-L2 14F5-D9	KVFNRFS		
217	HVR-L3 14F5-D9	SQSTLVPLT		
220	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 73H6-B8	QVQLKESGPG SYGVHWVRQP SALKSRLSIS AMYYCARQGG FITTAYYAMD YWGQSTSVTV SS	LVAPSQSLST PGKGLEWLVV KDNKSQVFL	TCTISGFSLT IWSGSGSTTYN KMNSLQTDOT
221	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 73H6-B8	DIVMSQSPSS NSRTRKNYLA ESGVPDRFTG VYYCKQSYNL YTFGGGSKLE IK	LAVSAGEKVT WYQQKPGQSP SGSGTDFTLT	MSCKSSQSLL KLLIYWASTR ISSVQARDLA
222	HVR-H1 73H6-B8	SYGVH		
223	HVR-H2 73H6-B8	VIWSGSGSTTY NSALKS		
224	HVR-H3 73H6-B8	QGGFITTAYY AMDY		
225	HVR-L1 73H6-B8	K3SQSLLSNR TRKNYLA		
226	HVR-L2 73H6-B8	WASTRES		
227	HVR-L3 73H6-B8	KQSYNLYT		
230	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 22G7-C9	QIQLVQSGPE DCSIHWVKQA ADDFKGRFAF TASYFCGTAY YRIDGALDYW GQGSTSVTVSS	LKRPGETVKI PGGGLKWMGW SLETSASTAF	SCKASGYTFT INTETGEPSY LQINNLSKSD
231	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 22G7-C9	DIVLTQSPAS TSSYSYMHWF GVPARFSGSG YQHSWELPW TFGGGSKLEI K	LAVSLGQRAT QQKPGQPEKL SGTDFTLNIN	ISCRASQSVS LIKYASNLES PVEEDTATY
232	HVR-H1 22G7-C9	DCSIH		
233	HVR-H2 22G7-C9	WINTETGEPS YADDFKG		
234	HVR-H3 22G7-C9	AYRYDGALE Y		
235	HVR-L1 22G7-C9	RASQSVSTSS YSYMH		
236	HVR-L2 22G7-C9	YASNLES		
237	HVR-L3 22G7-C9	QHSWELPWT		
240	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 7A11-C12	QIQLVQSGPD NYGMNHWKQA AEEFKGRFAF TATYFCARGT VSFPYWGQGT LVTVSA	LKKPGETVKI PGKGLKWMGW SLETSASTAY	SCKASGYTFT INTNTGEPTY LQIDNLKNEO
241	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 7A11-C12	DVVMSTPLS HSDGNTYLHW SGVPDRFSGS YFCSQSTHVI FTFGGSKLE IK	LPVSLGDHAS YLQKPGQSPK GSGTDFTLKI	ISCESSQNLV LLIYKVSNNR SRVEAEDLGV
242	HVR-H1 7A11-C12	NYGMN		
243	HVR-H2 7A11-C12	WINTNTGEPT YAEFPKG		
244	HVR-H3 7A11-C12	GTVSFPY		
245	HVR-L1 7A11-C12	R3SQNLVHSD GNTYLH		
246	HVR-L2 7A11-C12	KVSNRFS		
247	HVR-L3 7A11-C12	SQSTHVIPT		
250	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 12A10-E8	QIQLVQSGPE NYGMNHWKQA GDDFKGRFVF TATFFCARGG RPDYWGQGT VTVSS	LKKPGETVKI PGKGLKWMGW SLETSSVTYV	SCKASGYTFT INMYTGEPTY LQINNLSKSD
251	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 12A10-E8	DVIMTQTPLS HSDGNTYLEW SGVPDRFSGS YYCLOGSHVP YTFGGGSKLE IK	LPVSLGDQAS YLQKPGQSPK GSGTDFTLKI	ISCRSSQSIV LLIYKVSNNR NRVEAEDLGV
252	HVR-H1 12A10-E8	NYGMN		
253	HVR-H2 12A10-E8	WINMYTGEPT YGDDFKG		

254	HVR-H3 12A10-E8	GGRPDY
255	HVR-L1 12A10-E8	RSSQSIVHSH GNTYLE
256	HVR-L2 12A10-E8	KVFNRF
257	HVR-L3 12A10-E8	LQGSHPYT
260	Варіабельна область важкого ланцюга (VH)55E7-F11	EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCVASGGTFPS NYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRA EDTGIYYCAG YFYGGYFDVW GTGTTVTYSS
261	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 55E7-F11	ELVLTQSPFTT MAASPGKKIT ITCSASSSIS SNYLHWYQQK PGFSPKLLIY RTSNLASGV ARFSGSGSGT SYSLTIGTME AEDVATYYCQ QGSSLPFTFG SGTKEIK
262	HVR-H1 55E7-F11	NYWMN
263	HVR-H2 55E7-F11	QIRLKSDNYA THYAESVKG
264	HVR-H3 55E7-F11	YFYGGYFDV
265	HVR-L1 55E7-F11	SASSSISNY LH
266	HVR-L2 55E7-F11	RTSNLAS
267	HVR-L3 55E7-F11	QGSSLPFT
270	Варіабельна область важкого ланцюга (VH)52F6-F11	QVQLQQSGTE LARPGASVKL SCKASGYTFT HYWMHWIKQR PGQGLEWIGY IYPTNDYTKY NQNFRDKATL TADESSNSAY MQLNSLTIED SAVYYCARAG NRVDFWCGG TLTIVSS
271	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 52F6-F11	QAVVTQESAL TTSFGETVTL TCRSSTGAVT TSNFANWVQE KPDHLPTGLI GGTNNRAPGV PARFSGSLIG DKAALTITEA QTEDEAIYFC ALWYSNLWVF GGGTKLTVL
272	HVR-H1 52F6-F11	HYWMN
273	HVR-H2 52F6-F11	YIYPTNDYTK YNQNERD
274	HVR-H3 52F6-F11	AGNRFVDF
275	HVR-L1 52F6-F11	RSSTGAVTTS NFAN
276	HVR-L2 52F6-F11	GTNNRAP
277	HVR-L3 52F6-F11	ALWYSNLWV
280	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) Hu37D3-H9.v1	EVQLVESGGG LVQPGGSLFL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTY PDSVKGRFTI SRNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSS
281	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) Hu37D3-H9.v1	EDQLTQSPFS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNGNTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSRRF SGVPSRFSGS GSGTFTLTIT SSLQPEDPAT YYCFQGSLLP WTFGQGTKVE IK
282	HVR-H1 Hu37D3-H9.v1	SYGMS
283	HVR-H2 Hu37D3-H9.v1	TINSGGTYTYYPDSVKG
284	HVR-H3 Hu37D3-H9.v1	SYSGAMDY
285	HVR-L1 Hu37D3-H9.v1	RSSQSIVHSNGNTYFE
286	HVR-L2 Hu37D3-H9.v1	KVSNRF
287	HVR-L3 Hu37D3-H9.v1	FQGSLLPWT

288	Важкий ланцюг Hu37D3-H9.v1 IgG1	EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY KGPSVFPLAP PEPVTISWNS SLSSVTVFSS VDKKVEPKSC FLFPPKPKDT PEVKFNWYVD RVVSVLTIVLH PIEKTISKAK NQVSLTCLVK YKTTTFFVLDG NVFSCSVME	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG SSKSTSGGTA GALTSGVHTF SSLGTQTYIC DKTHTCPPCP GVEVHNAKTK QDNLNGKEYK GQPREPQVYT GFYPSDIAVE DGSFFLYSKL ALHNHYTQKS	SCAASGLIFR INSGGTYTYT LQMNSLRAED TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVNHKPSNTK APELLGGPSV CVVVOVSHED PREEQYNSTY CKVSNKALPA LPESREEMTK WESNGQPENN TVDKSRWQOG
289	Легкий ланцюг Hu37D3-H9.v1 IgG1	EDQLTQSPSS HSHGNTYFEW SGVPSRFSGS YYCFQGSLLP FIIPPSDEQL VQWKVDNALQ SSTLTLSKAD TKSEFNRGEC	LSASVGRVT YQQKPKGSPK GSGTDFTLTI WTFGQGTKVE KSGTASVVCL SGNSQGESVTE YEKHKVYACE	ITCRSSQSTV LLIYKVSNNR SSLQPEDFAT IKRTVAAPSV LNNFYPREAK QDSKUSTYSL VTHQGLSSPV
290	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) Hu37D3-H9.v5	EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG	SCAASGLIFR INSGGTYTYT LQMNSLRAED TLVTVSS
291	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) Hu37D3-H9.v5	EDVLTQTPLS HSHGNTYFEW SGVPDRFSGS YYCFQGSLLP	LPVTPGQPAS YLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTFGQGTKVE	ITCRSSQSTV LLIYKVSNNR SRVEAEDVGV IK
292	HVR-H1 Hu37D3-H9.v5	SYGMS		
293	HVR-H2 Hu37D3-H9.v5	TINSGGTYTYYPDSVKG		
294	HVR-H3 Hu37D3-H9.v5	SYSGAMDY		
295	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5	RSSQSIVHSHGNTYFE		
296	HVR-L2 Hu37D3-H9.v5	KVSNRFS		
297	HVR-L3 Hu37D3-H9.v5	FQGSLLVPWT		
300	Варіабельна область важкого ланцюга (VH)Hu94B2.v105	EVQLVQSGAE GYTMNWRQA NQKFKGRATL TAVYYCARQG	VKKEGASVKV PGQGLEWIGL TVDKSTSTAY AYWGQGTIVT	SCKASGYSLT LSPYNGVTSY LELSSLRSED VSS
301	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) Hu94B2.v105	DIVMTQTPLS DSDGKTYLNN SGVPDRFSGS YYCWQGTTFP	LPVTPGQPAS LLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTFGQGTKVE	ISCKSSQSLL RLIYLVSKLD SRVEAEDVGV IK
302	HVR-H1 Hu94B2.v105	GYTMN		
303	HVR-H2 Hu94B2.v105	LISPYNGVTSYNQKFKG		
304	HVR-H3 Hu94B2.v105	QGAY		
305	HVR-L1 Hu94B2.v105	KSSQSLLDSDGKTYLN		
306	HVR-L2 Hu94B2.v105	LVSKLDS		
307	HVR-L3 Hu94B2.v105	WQGTTFPWT		
310	Варіабельна область важкого ланцюга (VH)hu125B11.v17	EVQLVESGGG NYWMNWRQA HYAESVKGRE EDTAVYYCTG	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAQ TISRDDSKNT GTTYWGQGTI	SCAASRFIFS IRLKSUNYAT LYLQMNSLRA VTSS

311	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) hu125B11.v17	DIQMTQSPSS TAVAWYQOKP RFSGSGSGTD FRTYPYTFGQ	LSASVGDRV GKSEKLLIYS FTLTISSLQP GTKVEIK	ITCKASQNVG ASIRYTGVP EDFATYFCQQ
312	HVR-H1 hu125B11.v17	NYWMN		
313	HVR-H2 hu125B11.v17	QIRLKSDNYATHYAESVKG		
314	HVR-H3 hu125B11.v17	GTTY		
315	HVR-L1 hu125B11.v17	KASQNVGTAVA		
316	HVR-L2 hu125B11.v17	SASIRYT		
317	HVR-L3 hu125B11.v17	QQFRTYPYT		
320	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) hu125B11.v26	EVQLVESGGG NYWMNWVRFQA HYAESVKGRF EDTAVYYCTG	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAQ TISRDNSKNT GTTYWGQGT	SCAASRFIF IRLKSDNYAT LYLQMNSLRA
321	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) hu125B11.v26	DIQMTQSPSS TAVAWYQOKP RFSGSGSGTD FRTYPYTFGQ	LSASVGDRV GKAPKLLIYE FTLTISSLQP GTKVEIK	ITCKASQNVG ASIRYTGVP EDFATYFCQQ
322	HVR-H1 hu125B11.v26	NYWMN		
323	HVR-H2 hu125B11.v26	QIRLKSDNYATHYAESVKG		
324	HVR-H3 hu125B11.v26	GTTY		
325	HVR-L1 hu125B11.v26	KASQNVGTAVA		
326	HVR-L2 hu125B11.v26	SASIRYT		
327	HVR-L3 hu125B11.v26	QQFRTYPYT		
330	Варіабельна область важкого ланцюга (VH)hu125B11.v28	EVQLVESGGG NYWMNWVRQA HYAESVKGRF EDTAVYYCTG	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAQ TISRDNSKNT GTTYWGQGT	SCAASRFIF IRLKSDNYAT LYLQMNSLRA
331	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) hu125B11.v28	DIQMTQSPSS TAVAWYQOKP RFSGSGSGTD FRTYPYTFGQ	LSASVGDRV GKAPKLLIYS FTLTISSLQP GTKVEIK	ITCKASQNVG ASIRYTGVP EDFATYFCQQ
332	HVR-H1 hu125B11.v28	NYWMN		
333	HVR-H2 hu125B11.v28	QIRLKSDNYATHYAESVKG		
334	HVR-H3 hu125B11.v28	GTTY		
335	HVR-L1 hu125B11.v28	KASQNVGTAVA		
336	HVR-L2 hu125B11.v28	SASIRYT		
337	HVR-L3 hu125B11.v28	QQFRTYPYT		
340	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) Hu37D3-H9.v28.A4	EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQ	SCAASGLIFR INSGGTYYTY LQMNSLRAED
341	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) Hu37D3-H9.v28.A4	DDVLTQTPLS HSNGNTYLEW SGVFDKPSGS YYCFQGSGLVP	LPVTPGQPAS YLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTFGQGTKVEIK	ISCRSSQSIV LLIYKVSNRF SRVEAEDVGV
342	HVR-H1 H9.v28.A4	SYGMS		
343	HVR-H2 H9.v28.A4	TINSGGTYYTYYPDSVKG		
344	HVR-H3 H9.v28.A4	SYSGAMDY		

345	HVR-L1 H9.v28.A4	Hu37D3-	RSSQSIVHSNGNTYLE	
346	HVR-L2 H9.v28.A4	Hu37D3-	KVSNRFS	
347	HVR-L3 H9.v28.A4	Hu37D3-	FQGSILVFWT	
348	Важкий ланцюг Hu37D3-H9.v28.A4 IgG4-S228P.YTE		EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYF PDGVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRASG TAVYYCANSY SGANDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPFTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTNTYTC NVDHKFSNTK VDKRVESKYG PFCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTILYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKARGQF REPQVYTLFP SQEEMTKNOV SLTCLVKGEY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVE SCSVMEALH NRYTQKSLSL SLGK	
602	Важкий ланцюг Hu37D3-H9.v28.A4 IgG4-S228P.YTE des-k		EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYF	
349	Легкий ланцюг Hu37D3- H9.v28.A4 IgG4- S228P.YTE		DDVLTQTPLS LPVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPQ LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGSILP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFFPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK VQWVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSYSL ESTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSENRGEC	
442	hu125B11-H3.LC1		DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKSEKLLIYS ASIRYTGVP RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FRTYPYTEGG GTKVEIK	
443	hu125B11-H3.LC2		DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASIRYTGVP RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FRTYPYTEGG GTKVEIK	
444	hu125B11-H3.LC3		DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKSEKLLIYS ASIRYTGVP RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FRTYPYTEGG GTKVEIK	
445	hu125B11-H3.LC4		DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASIRYTGVP RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FRTYPYTEGG GTKVEIK	
446	hu125B11-H3.HC1		EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRPIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDESKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQSTL VTVSS	

447	hu125B11-H3.HC2	EVQLVESGGG NYWMNWVRQA HYAESVKGRF EDTAVYYCTG	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAQ TISRDN SKNT GTTYWGQGT L VTVSS	SCAASRFIFP IRLKSDNYAT VYLQMNSLRA
448	hu125B11-H3.HC3	EVQLVESGGG NYWMNWVRQA HYAESVKGRF EDTAVYYCTG	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAQ TISRDN SKNT GTTYWGQGT L VTVSS	SCAASRFIFS IRLKSDNYAT LYLQMNSLRA
449	hu125B11-H3.HC4	EVQLVESGGG NYWMNWVRQA HYAESVKGRF EDTAVYYCTG	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAQ TISRDN SKNT GTTYWGQGT L VTVSS	SCAASRFIFS IRLKSDNYAT LYLQMNSLRA
450	hu125B11-H3.HC5	EVQLVESGGG NYWMNWVRQA HYAESVKGRF EDTAVYYCTG	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAQ TISRDN SKNT GTTYWGQGT L VTVSS	SCAASRFIFS IRLKSDNYAT VYLQMNSLRA
451	Hu125B11-H3.HC6	EVQLVESGGG NYFMNWVRQA HYAESVKGRF EDTAVYYCTG	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAQ TISRDN SKNT GTTYWGQGT L VTVSS	SCAASRFIFS IRLKSDNYAT VYLQMNSLRA
452	Hu94B2.HC1	EVQLVQSGAE GYTMNWVRQA NQKFKGRATL TAVYYCARQG	VKKPGASVRV PGQGLEWIGL TVDKSTSTAY AYWGQGT LVT VSS	SCKASGYSLT ISPYNGVTSY LELSSLRSED
453	Hu94B2.HC2	EVQLVQSGAE GYTMNWVRQA NQKFKGRVTL TAVYYCARQG	VKKPGASVKV PGQGLEWIGL TVDKSTSTAY AYWGQGT LVT VSS	SCKASGYSLT ISPYNGVTSY LELSSLRSED
454	Hu94B2.HC3	EVQLVQSGAE GYTMNWVRQA NQKFKGRATI TAVYYCARQG	VKKPGASVKV PGQGLEWIGL TVDKSTSTAY AYWGQGT LVT VSS	SCKASGYSLT ISPYNGVTSY LELSSLRSED
455	Hu94B2.HC4	EVQLVQSGAE GYTMNWVRQA NQKFKGRATL TAVYYCARQG	VKKPGASVKV PGQGLEWIGL TRDKSTSTAY AYWGQGT LVT VSS	SCKASGYSLT ISPYNGVTSY LELSSLRSED
456	Hu94B2.HC5	EVQLVQSGAE GYTMNWVRQA NQKFKGRATL TAVYYCARQG	VKKPGASVRV PGQGLEWIGL TVDTSTSTAY AYWGQGT LVT VSS	SCKASGYSLT ISPYNGVTSY LELSSLRSED
457	Hu94B2.HC6	EVQLVQSGAE GYTMNWVRQA NQKFKGRVTI TAVYYCARQG	VKKPGASVKV PGQGLEWIGL TVDKSTSTAY AYWGQGT LVT VSS	SCKASGYSLT ISPYNGVTSY LELSSLRSED
458	Hu94B2.HC7	EVQLVQSGAE GYTMNWVRQA NQKFKGRVTI TAVYYCARQG	VKKPGASVKV PGQGLEWIGL TRDKSTSTAY AYWGQGT LVT VSS	SCKASGYSLT ISPYNGVTSY LELSSLRSED
459	Hu94B2.HC8	EVQLVQSGAE GYTMNWVRQA NQKFKGRVTI TAVYYCARQG	VKKPGASVKV PGQGLEWIGL TVDTSTSTAY AYWGQGT LVT VSS	SCKASGYSLT ISPYNGVTSY LELSSLRSED

460	Hu94B2.LC9	DVVMTQTPLS DSDGKTYLNW SGVPDRFSGS YYCWQGTTHFP	LPVTFGQPAS LLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTFGQGTKVE IK	ISCKSSQSLL RLIYLVSKLD SRVEAEDVGV
461	Hu94B2.LC10	DVVMTQTPLS DSDGKTYLNW SGVPDRFSGS YYCWQGTTHFP	LPVTFGQPAS LLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTFGQGTKVE IK	ISCKSSQSLL LLIYLVSKLD SRVEAEDVGV
462	Hu94B2.LC11	DVVMTQTPLS DSDGKTYLNW SGVPDRFSGS YYCWQGTTHFP	LPVTFGQPAS YLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTFGQGTKVE IK	ISCKSSQSLL RLIYLVSKLD SRVEAEDVGV
463	Hu94B2.LC12	DVVMTQTPLS DSDGKTYLNW SGVPDRFSGS YYCWQGTTHFP	LPVTFGQPAS YLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTFGQGTKVE IK	ISCKSSQSLL LLIYLVSKLD SRVEAEDVGV
464	Hu94B2.LC13	DIVMTQTPLS DSDGKTYLNW SGVPDRFSGS YYCWQGTTHFP	LPVTFGQPAS LLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTFGQGTKVE IK	ISCKSSQSLL RLIYLVSKLD SRVEAEDVGV
465	Hu94B2.LC14	DIVMTQTPLS DSDGKTYLNW SGVPDRFSGS YYCWQGTTHFP	LPVTFGQPAS LLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTFGQGTKVE IK	ISCKSSQSLL LLIYLVSKLD SRVEAEDVGV
466	Hu94B2.LC15	DIVMTQTPLS DSDGKTYLNW SGVPDRFSGS YYCWQGTTHFP	LPVTFGQPAS YLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTFGQGTKVE IK	ISCKSSQSLL RLIYLVSKLD SRVEAEDVGV
467	Hu94B2.LC16	DIVMTQTPLS DSDGKTYLNW SGVPDRFSGS YYCWQGTTHFP	LPVTFGQPAS YLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTFGQGTKVE IK	ISCKSSQSLL LLIYLVSKLD SRVEAEDVGV
468	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5.1	RSSQSIVHSNANTYPE		
469	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5.2	RSSQSIVHSSGNTYPE		
470	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5.3	RSSQSIVHSDGNTYPE		
471	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5.4	RSSQSIVHSQGNTYPE		
472	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5.5	RSSQSIVHSEGNTYPE		
473	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5.6	RSSQSIVHSAGNTYPE		
474	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5.7	RSSQSIVHSNGDTYPE		
475	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5.8	RSSQSIVHSNCQTYPE		
476	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5.9	RSSQSIVHSNGETTYPE		
477	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5.10	RSSQSIVHSNGATTYPE		
478	HVR-L1 Hu37D3-H9.v5.11	RSSQSIVHSNGGTYPE		
479	HVR-L1 Hu37D3.v28	RSSQSIVHSNGNTYPE		
480	HVR-L1 Hu37D3.v28.A2	RSSQSIVHSNGNTYPE		
481	HVR-L1 Hu37D3.v28.A4	RSSQSIVHSNGNTYLE		
482	HVR-L1 Hu37D3.v28.A6	RSSQSIVHSNGNTYLE		
483	HVR-L1 Hu37D3.v28.A8	RSSQSIVHSNGNTYPE		
484	HVR-L1 Hu37D3.v28.A10	RSSQSIVHSNGNTYPE		
485	HVR-L1 Hu37D3.v28.A12	RSSQSIVHSNGNTYLE		
486	HVR-L1 Hu37D3.v28.A14	RSSQSIVHSNGNTYLE		

487	HVR-L1 Hu37D3.v28.A16	RSSQSIVHSNGNTYFE
488	HVR-L1 Hu37D3.v28.A18	RSSQSIVHSNGNTYFE
489	HVR-L1 Hu37D3.v28.A20	RSSQSIVHSNGNTYFE
490	HVR-L1 Hu37D3.v28.A22	RSSQSIVHSNGNTYFE
491	HVR-L1 Hu37D3.v28.A24	RSSQSIVHSNGNTYFE
492	HVR-L1 Hu37D3.v28.A26	RSSQSIVHSNGNTYFE
493	HVR-L1 Hu37D3.v28.A28	RSSQSIVHSNGNTYFE
494	HVR-L1 Hu37D3.v28.A30	RSSQSIVHSNGNTYFE
495	HVR-L1 Hu37D3.v28.B1	RSSQSIVHSIGNTFFE
496	HVR-L1 Hu37D3.v28.B2	RSSQSIVHSMGNTFFE
497	HVR-L1 Hu37D3.v28.B3	RSSQSIVHSQGNWFE
498	HVR-L1 Hu37D3.v28.B4	RSSQSIVHSQGNTHFE
499	HVR-L1 Hu37D3.v28.B6	RSSQSIVHSDGNTRFE
500	HVR-L1 Hu37D3.v28.B7	RSSQSIVHSDGNTKFE
501	HVR-L1 Hu37D3.v28.B8	RSSQSIVHSEGNTRFE
502	HVR-L1 Hu37D3.v28.C1	RSSQSIVHSNNNTYFE
503	HVR-L1 Hu37D3.v28.C2	RSSQSIVHSNDNTYFE
504	HVR-L1 Hu37D3.v28.D1	RSSQSIVHANGNTYFE
505	HVR-L1 Hu37D3.v28.E1	RSSQSIVNSNGNTYFE
506	HVR-L1 Hu37D3.v28.E2	RSSQSIVQSNNGNTYFE
507	HVR-L1 Hu37D3.v28.E3	RSSQSIVDSDGNTYFE
508	HVR-L1 Hu37D3.v28.F1	RSSQSIVHSNTNTYFE
509	HVR-L1 Hu37D3.v28.F2	RSSQSIVHTNGNTYFE
510	HVR-L1 Hu37D3.v28.F3	RSSQSIVHTNANTYFE
511	HVR-L1 Hu37D3.v28.51	RSSQSIVHSHGNTYFE
512	HVR-L1 Hu37D3.v28.52	RSSQSIVHSHKNTYFE
513	HVR-L1 Hu37D3.v28.53	RSSQSIVRSRGNTYFE
514	HVR-L1 Hu37D3.v28.54	RSSQSIVHSLGNTYFE
515	HVR-L1 Hu37D3.v28.55	RSSQSIVHSNQNTYFE
516	HVR-L1 Hu37D3.v28.56	RSSQSIVRSNYNTYFE
517	HVR-L1 Hu37D3.v28.57	RSSQSIVHSNENTYFE
518	HVR-L1 Hu37D3.v29.1	RSSQSIVHSNGDNTYFE
519	HVR-L1 Hu37D3.v29.2	RSSQSIVHSNGQNTYFE
520	HVR-L1 Hu37D3.v29.3	RSSQSIVHSNGETNTYFE
521	HVR-L1 Hu37D3.v29.4	RSSQSIVHSNGATNTYFE
522	HVR-L1 Hu37D3.v29.5	RSSQSIVHSNGHTNTYFE
523	HVR-L1 Hu37D3.v29.6	RSSQSIVHSNGKNTYFE
524	HVR-L1 Hu37D3.v29.7	RSSQSIVHSNGLNTYFE
525	HVR-L1 Hu37D3.v29.8	RSSQSIVHSNADNTYFE
526	HVR-L1 Hu37D3.v29.9	RSSQSIVHSNAQNTYFE
527	HVR-L1 Hu37D3.v29.10	RSSQSIVHSNAENTYFE
528	HVR-L1 Hu37D3.v29.11	RSSQSIVHSNAATNTYFE
529	HVR-L1 Hu37D3.v29.12	RSSQSIVHSNAHTNTYFE
530	HVR-L1 Hu37D3.v29.13	RSSQSIVHSNAKNTYFE
531	HVR-L1 Hu37D3.v29.14	RSSQSIVHSNALNTYFE
532	HVR-L1 Hu37D3- H9.v30.1	RSSQSIVHSGGNTYFE
533	HVR-L1 Hu37D3-	RSSQSIVHSTGNTYFE

	H9.v30.2		
534	HVR-L1 H9.v30.3	Hu37D3-	RSSQSIVHSGVNTYFE
535	HVR-L1 H9.v30.4	Hu37D3-	RSSQSIVHSLGNTYFE
536	HVR-L1 H9.v30.5	Hu37D3-	RSSQSIVHSIGNTYFE
537	HVR-L1 H9.v30.6	Hu37D3-	RSSQSIVHSPGNTYFE
538	HVR-L1 H9.v30.7	Hu37D3-	RSSQSIVHSFGNTYFE
539	HVR-L1 H9.v30.8	Hu37D3-	RSSQSIVHSYGNTYFE
540	HVR-L1 H9.v30.9	Hu37D3-	RSSQSIVHSHGNTYFE
541	HVR-L1 H9.v30.10	Hu37D3-	RSSQSIVHSHKNTYFE
542	HVR-L1 H9.v30.11	Hu37D3-	RSSQSIVHSRGNTYFE
543	HVR-L1 H9.v31.1	Hu37D3-	RSSQSIVHSNAGTYFE
544	HVR-L1 H9.v31.2	Hu37D3-	RSSQSIVHSNAVTYFE
545	HVR-L1 H9.v31.3	Hu37D3-	RSSQSIVHSNAITYFE
546	HVR-L1 H9.v31.4	Hu37D3-	RSSQSIVHSNAPTIFYFE
547	HVR-L1 H9.v31.5	Hu37D3-	RSSQSIVHSNAPTIFYFE
548	HVR-L1 H9.v31.6	Hu37D3-	RSSQSIVHSNAYTYFE
549	HVR-L1 H9.v31.7	Hu37D3-	RSSQSIVHSNARTYFE
550	HVR-L1 H9.v31.8	Hu37D3-	RSSQSIVHSNANVYFE
551	HVR-L1 H9.v31.9	Hu37D3-	RSSQSIVHSNANIYFE
552	HVR-L1 H9.v31.10	Hu37D3-	RSSQSIVHSNANPYFE
553	HVR-L1 H9.v31.11	Hu37D3-	RSSQSIVHSNANPYFE
554	HVR-L1 H9.v31.12	Hu37D3-	RSSQSIVHSNANYTYFE
555	HVR-L1 H9.v31.13	Hu37D3-	RSSQSIVHSNANNYFE
556	HVR-L1 H9.v31.14	Hu37D3-	RSSQSIVHSNANRYFE
557	Пептид 7-24 тау-білка людини		EFEVMEDHAGTYGLGDRK
558	Пептид 7-20 тау-білка людини		EFEVMEDHAGTYGL
560	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) Hu37D3.v39		EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSCGTYYTY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSS

561	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) Hu37D3.v39	EDQLTQSPSS HSNGNTYLEW SGVPSRFSGS YYCFQGSLVP	LSASVGDRV YQKPGKSPK GSGTDFTLT WTFQGQGTKVE IK	ITCRSSQSIV LLIYKVSNNR SSLQPEDFAT
562	HVR-H1 Hu37D3.v39	SYGMS		
563	HVR-H2 Hu37D3.v39	TINSGGTYTYYPDSVKG		
564	HVR-H3 Hu37D3.v39	SYSCAMDY		
565	HVR-L1 Hu37D3.v39	RSSQSIVHSNGNTYLE		
566	HVR-L2 Hu37D3.v39	KVSNRFS		
567	HVR-L3 Hu37D3.v39	FQGSLLVPWT		
568	Важкий ланцюг Hu37D3.v39 S228P.YTE IgG4-	EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY KGPSVFPLAP PEPVTWSNS SLSSVTVPS VDKRVESKYG PPKPKDTLYI QFNWYVDGVE SVLTVLHQDW KTISKAKGQP SLTCLVKGPY TPPVLDSDGS SCSYVMEALH NHYTQKSLSL SLGK	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG CSRSTSESTA GALTSGVHTF SSLGTETITC PPCFPCPAPE TREPEVTCVV VHNAKTKPRE LNGKEYKCKV HEPQVYTLPP PSDIAVEWES FFLYSRLTVD KSRWQEGNVE	SCAASGLIFR INSGGTYTY LQMNSLRAED TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVDHKPSNTK FLGGPSVPLE VDVSGEDPEV EQFNSTYRVV SNKGLPSSIE SQEEMTKNQV NGQPENNYKT KSRWQEGNVE
569	Легкий ланцюг Hu37D3.v39 S228P.YTE IgG4-	EDQLTQSPSS HSNGNTYLEW SGVPSRFSGS YYCFQGSLVP ETFPSSDEQL VQWVKVDNALQ SSTLTLSKAD TKSEFNRGEC	LSASVGDRV YQKPGKSPK GSGTDFTLT WTFQGQGTKVE KSGTASVVCL SGNSQESVTE YEKHKVYACE	ITCRSSQSIV LLIYKVSNNR SSLQPEDFAT IKRTVAAPSV LNNFYFREAK QDSKDSSTYS VTHQGLSSPV
570	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) Hu37D3.v40	EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG	SCAASGLIFR INSGGTYTY LQMNSLRAED TLVTVSS
571	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) Hu37D3.v40	EDQLTQSPSS HSNTNTYFEW SGVPSRFSGS YYCFQGSLVP	LSASVGDRV YQKPGKSPK GSGTDFTLT WTFQGQGTKVE IK	ITCRSSQSIV LLIYKVSNNR SSLQPEDFAT
572	HVR-H1 Hu37D3.v40	SYGMS		
573	HVR-H2 Hu37D3.v40	TINSGGTYTYYPDSVKG		
574	HVR-H3 Hu37D3.v40	SYSCAMDY		
575	HVR-L1 Hu37D3.v40	RSSQSIVHSNTNTYFE		
576	HVR-L2 Hu37D3.v40	KVSNRFS		
577	HVR-L3 Hu37D3.v40	FQGSLLVPWT		

578	Важкий Hu37D3.v40 S228P.YTE	ланцюг IgG4-	EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY KGPSVFPLAP PEPVTVSWNS SLSSVTVPS VDKRVESKYG PPKPKDTLYI QFNWYVDGVE SVLTVLHQDW KTISKAKGQP SLTCLVKGFY TPPVLDSDGS SCSVMHEALH	LVQPGGSLRL FKGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG CSRSTSESTA GALTSGVHTF SSLGTKTYTC PPCPPCPAPE TREPEVTCVV VHNAKTKPRE LNSKEYKCKV REPQVYTLPP PSDIAVEWES FFLYSRLTVD NHYTQKSLSL SLGK	SCAASGLIFR INSGGTYTY Y LQMNSLRAED TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVDHKPSNTK FLGGPSVFLF VDVSEQDPEV EQFNSTYRVV SNKGLPSSIE SQEEMTKNQV NGQFENNYKT KSRWQEGNVF
579	Легкий Hu37D3.v40 S228P.YTE	ланцюг IgG4-	EDQLTQSPSS HSMTNTYFEW SGVPSRFSQS YYCFQGS LVP FIFPPSDEQL VQWVKDONALQ SSTLTLSKAD TKSFNRGEC	LSASVGDRVT YQQKPGKSPK GSCTDFTLTI WTEGQGTKVE KSGTASVVCL SGNSQESVTE YEKHKVYACE	ITCRSSQSIV LLIYKVS NRE SSLOPEDFAT IKRTVAAPSV LNNFYPREAK QDSKDYSTSL VTHQGLSSPV
580	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) Hu37D3.v41		EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY	LVQPGGSLRL FKGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG	SCAASGLIFR INSGGTYTY Y LQMNSLRAED TLVTVSS
581	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) Hu37D3.v41		EDQLTQSPSS HSMTNTYFEW SGVPSRFSQS YYCFQGS LVP	LSASVGDRVT YQQKPGKSPK GSCTDFTLTI WTEGQGTKVE	ITCRSSQSIV LLIYKVS NRE SSLOPEDFAT IK
582	HVR-H1 Hu37D3.v41		SYGMS		
583	HVR-H2 Hu37D3.v41		TINSGGTYTYYPDSVKG		
584	HVR-H3 Hu37D3.v41		SYSGAMDY		
585	HVR-L1 Hu37D3.v41		RSSQSTIVHSNGQTYFE		
586	HVR-L2 Hu37D3.v41		KVSNRFS		
587	HVR-L3 Hu37D3.v41		FQGS LVPWT		
588	Важкий Hu37D3.v41 S228P.YTE	ланцюг IgG4-	EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY KGPSVFPLAP PEPVTVSWNS SLSSVTVPS VDKRVESKYG PPKPKDTLYI QFNWYVDGVE SVLTVLHQDW KTISKAKGQP SLTCLVKGFY TPPVLDSDGS SCSVMHEALH	LVQPGGSLRL FKGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG CSRSTSESTA GALTSGVHTF SSLGTKTYTC PPCPPCPAPE TREPEVTCVV VHNAKTKPRE LNSKEYKCKV REPQVYTLPP PSDIAVEWES FFLYSRLTVD NHYTQKSLSL SLGK	SCAASGLIFR INSGGTYTY Y LQMNSLRAED TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVDHKPSNTK FLGGPSVFLF VDVSEQDPEV EQFNSTYRVV SNKGLPSSIE SQEEMTKNQV NGQFENNYKT KSRWQEGNVF

589	Легкий Hu37D3.v41 S228P.YTE	ланцюг IgG4-	EDQLTQSPSS HNGGTYFEW SGVPSRFSGS YYCFQGS LVP FIFPPSDEQL VQWKVDNALQ SSTLTLSKAD TKSFNRGEC	LSASVGDRVT YQOKFGKSPK GGTDFTLTI WTFGQGTKVE KSGTASVVCL SGNSQESVTE YEKHKVYACE	ITCRSSQSIV LLIYKVS NRP SSLQPEDFAT IKRTVAAPSV LNNFYPREAK QDSKDYSTYS VTHQGLSSPV
590	Важкий Hu37D3-H9.v1 S228P	ланцюг IgG4-	EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY KGPSVFPLAP PEPVTVSWNS SLSSVTVTPS VDKRVESKYG PPKPKDTLMI QFNWYVDGVE SVLTVLHQDW KTISKARGQP SLTCLVKGFY TPPVLDSDGS SCSVMHEALH	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAT SRDSKNTLY SGAMDYWGQG CSRSTSESTA GALTSGVHTF SSLGTKTYTC PPCPFCPAFE SRTPEVTCVV VHNAKTRFRE LNGKEYKCKV KEPQVYTLPP PSDIAVEWES FFLYSRLTVD NHYTQKSLSL	SCAASGLIFR INSGGTYTYV LQMNSLRAD TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVDHKPSNTK FLCGPSVFLP VDVSGEDPEV EQFNSTYRVV SNKGLPSSIE SQEEMTKNQV NGQFENNYKT KSRWQEGNVP
591	Легкий ланцюг Hu37D3-H9.v1 IgG4		EDQLTQSPSS HNGGTYFEW SGVPSRFSGS YYCFQGS LVP FIFPPSDEQL VQWKVDNALQ SSTLTLSKAD TKSFNRGEC	LSASVGDRVT YQOKFGKSPK GGTDFTLTI WTFGQGTKVE KSGTASVVCL SGNSQESVTE YEKHKVYACE	ITCRSSQSIV LLIYKVS NRP SSLQPEDFAT IKRTVAAPSV LNNFYPREAK QDSKDYSTYS VTHQGLSSPV
592	MAPT (10-24)		VMEDHAGTYGLGDRK		
593	MAPT(2-24)		AEPRQEFVMEHAGTYGLGDRK		
594	MAPT(2-34)		AEPRQEFVMEHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQD		
595	MAPT (10-44)		VMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTAGLK		
596	MAPT(2-24)Y18A		AEPRQEFVMEHAGTAGLGDRK		
597	MAPT(2-24)L20A		AEPRQEFVMEHAGTYGAGDRK		
598	hu113F5-F7.LC1		DIQMTQSPSS TAVAWYQOKP RFSGSGSGTD FSTYPYTFGQ	LSASVGDRVT GKSPKLLIYS FTLTISSLQP GTKVEIK	ITCKASQNVG ASRRFSGVPS EDFATYFCQQ
599	hu113F5-F7.LC2		DIQMTQSPSS TAVAWYQOKP RFSGSGSGTD FSTYPYTFGQ	LSASVGDRVT GKAPKLLIYS FTLTISSLQP GTKVEIK	ITCKASQNVG ASRRFSGVPS EDFATYFCQQ
600	hu113F5-F7.LC3		DIQMTQSPSS TAVAWYQOKP RFSGSGSGTD FSTYPYTFGQ	LSASVGDRVT GKSPKLLIYS FTLTISSLQP GTKVEIK	ITCKASQNVG ASRRFSGVPS EDFATYFCQQ
601	hu113F5-F7.LC4		DIQMTQSPSS TAVAWYQOKP RFSGSGSGTD FSTYPYTFGQ	LSASVGDRVT GKAPKLLIYS FTLTISSLQP GTKVEIK	ITCKASQNVG ASRRFSGVPS EDFATYFCQQ

603	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) Hu37D3-H9.v76	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTRTTY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSS
604	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) Hu37D3-H9.v76	DDLITQTPLS LPVTPGQPAS ISCRSSQSIV RSNGNTYLEW YLOKPGQSPQ LLTYKVSNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGTLPV WTPGQGTKVE IK
605	Hu37D3-H9.v76 HVR-H1 Hu37D3-H9.v83 HVR-H1 Hu37D3-H9.v93 HVR-H1	SYGMS
606	Hu37D3-H9.v76 HVR-H2 Hu37D3-H9.v83 HVR-H2 Hu37D3-H9.v93 HVR-H2	TINSGGTRTYYPDSVKG
607	Hu37D3-H9.v76 HVR-H3 Hu37D3-H9.v83 HVR-H3 Hu37D3-H9.v93 HVR-H3	SYSGAMDY
608	Hu37D3-H9.v76 HVR-L1 Hu37D3-H9.v83 HVR-L1 Hu37D3-H9.v93 HVR-L1	RSSQSTIVHSNGNTYLE
609	Hu37D3-H9.v76 HVR-L2 Hu37D3-H9.v83 HVR-L2 Hu37D3-H9.v93 HVR-L2	KVSNRFS
610	Hu37D3-H9.v76 HVR-L3 Hu37D3-H9.v83 HVR-L3 Hu37D3-H9.v93 HVR-L3	FQGTLPVWT
611	Важкий ланцюг IgG4-Hu37D3-H9.v76 S228P.YTE	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTRTTY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTKITYTC NVDHKPNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP RSPQVYTLPP SQEENTKNQV SLTCLVKGFI PSDIAVEWES NGQOPENNYKT TPPVLDSDGS PFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
612	Важкий ланцюг IgG4-Hu37D3-H9.v76 S228P.YTE des-K	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTRTTY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTKITYTC NVDHKPNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE

		KTISKAKGQP SLTCLVKGFY TPPVLDSDGS SCSVMEALH NHYTQKSLSL SLG	REPQVYTLFP PSDIAVEWES FFLYSRLTVD	SQEEMTKNQV NGQPENNYKT KSRWQEGNVF
613	Легкий ланцюг Hu37D3-H9.v76 IgG4-S228P.YTE	ODLLTQTPLS HSNGNTYLEW SGVPDRFSGS YYCFQGTLPV FTFPPSDEQL VQWKVDNALQ SSTLTLSKAD TKSFNRGEC	LPVTFGQPAS YLQKPGQSPQ GSGTDFTLKI WTPGQGTKVE KSGTASVVCL SGNSQESYTE YEKHKVYACE	ISCRSSQSIV LLIYKVSNRF SRVEAEDVGV IKRTVAAPSV LNNFYPREAK QDSKDYSTSL VTHQCLSSPV
614	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) Hu37D3-H9.v83	EVQLLESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY	LVQPGGSLRL PGRGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG TLVTVSS	SCAASGLIFR INSGGTRITYY LQMNSLRAED
615	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) Hu37D3-H9.v83	ODLLTQSFPLS HSNGNTYLEW SGVPDRFSGS YYCFQGTLPV	LPVTLGQPAS YQQRPGQSPR GSGTDFTLKI WTFQGQTKVE IK	ISCRSSQSIV LLIYKVSNEF SRVEAEDVGV
616	Важкий ланцюг Hu37D3-H9.v83 IgG4-S228P.YTE	EVQLLESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY KGPSVFPLAP PEPVTVSWNS SLSSVTVPS VDKRVESKYG PPKPKDTLYI QFNWYVDGVE SVLTFLHQDW KTISKAKGQP SLTCLVKGFY TPPVLDSDGS SCSVMEALH NHYTQKSLSL SLGK	LVQPGGSLRL PGRGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG CSRSTSESTA GALTSGVHTF SSLGTKTYTC PPCFPCPAPE TREPEVTCVV VHNAKTKPRE LNGKEYCKV REPQVYTLFP PSDIAVEWES FFLYSRLTVD	SCAASGLIFR INSGGTRITYY LQMNSLRAED TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVDHKPSNTK FLGGPSVFLF VDVDSQEDPEV EQFNSTYRVV SNKGLPSSIE SQAEMTKNQV NGQPENNYKT KSRWQEGNVF
617	Важкий ланцюг Hu37D3-H9.v83 IgG4-S228P.YTE des-K	EVQLLESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY KGPSVFPLAP PEPVTVSWNS SLSSVTVPS VDKRVESKYG PPKPKDTLYI QFNWYVDGVE SVLTFLHQDW KTISKAKGQP SLTCLVKGFY TPPVLDSDGS SCSVMEALH NHYTQKSLSL SLG	LVQPGGSLRL PGRGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG CSRSTSESTA GALTSGVHTF SSLGTKTYTC PPCFPCPAPE TREPEVTCVV VHNAKTKPRE LNGKEYCKV REPQVYTLFP PSDIAVEWES FFLYSRLTVD	SCAASGLIFR INSGGTRITYY LQMNSLRAED TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVDHKPSNTK FLGGPSVFLF VDVDSQEDPEV EQFNSTYRVV SNKGLPSSIE SQAEMTKNQV NGQPENNYKT KSRWQEGNVF

618	Легкий ланцюг Hu37D3-H9.v83 IgG4-S228P.YTE	EDLLTQSPFLS HENGNTYLEW SGVPSDRFSGS YYCFQGTLPV EIFFPPSDEQL VQWKVDNALQ SSTLTLSKAD TKSFNRGEC	LPVTLGQPAS YQQRPGQSPR GSGTDFTLKI WTFGQGTKVE KSGTASVVCL SGNSQESVTE YEKHKVYACE	ISCRSSQSIIV LLIYKVSNNRF SRVEAEDVGV IKETVAAPSV LNNFYFREAK QDSKSDSTYSL VTHQGLSSPV
619	Варіабельна область важкого ланцюга (VH) Hu37D3-H9.v93	EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG TLVTVSS	SCAASGLIFR INSGGTRTYT LQMNSLRAED
620	Варіабельна область легкого ланцюга (VL) Hu37D3-H9.v93	EDLLTQSPSS HENGNTYLEW SGVPSRFSGS YYCFQGTLPV	LSASVGDRTV YQQRPGKSPK GSGTDFTLTI WTFGQGTKVE IK	ITCRSSQSIIV LLIYKVSNNRF SSLPEDFAT
621	Важкий ланцюг Hu37D3-H9.v93 IgG4-S228P.YTE	EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY KGPSVPELAP PEPVTWSNS SLSSVTVPS VDKRVESKYC EPKPKDTLYI QFNWYVDGVE SVLTVLHQDW KTISKAKGQP SLTCLVKGPY TPPVLDSDGS SCSVMHEALH	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG CSRSTSESTA GALTSGVHTF SSLGTKTYTC PPCPPCPAPE TREPEVTCVV VHNAKTKPRE LNGKEYKCKV REFQVYTLPP PDIKAVEWES FFLYSRLTVD NHYTQKSLSL SLGK	SCAASGLIFR INSGGTRTYT LQMNSLRAED TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVDHKPSNTK FLGGPSVFLF VDVSDQEDPEV EQFNSTYRVV SNKGLPSSIE SQEEMTKNQV NGQPENNYKT KSRWQEGNVE
622	Важкий ланцюг Hu37D3-H9.v93 IgG4-S228P.YTE des-K	EVQLVESGGG SYGMSWVRQA PDSVKGRFTI TAVYYCANSY KGPSVPELAP PEPVTWSNS SLSSVTVPS VDKRVESKYC EPKPKDTLYI QFNWYVDGVE SVLTVLHQDW KTISKAKGQP SLTCLVKGPY TPPVLDSDGS SCSVMHEALH	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAT SRDNSKNTLY SGAMDYWGQG CSRSTSESTA GALTSGVHTF SSLGTKTYTC PPCPPCPAPE TREPEVTCVV VHNAKTKPRE LNGKEYKCKV REFQVYTLPP PDIKAVEWES FFLYSRLTVD NHYTQKSLSL SLG	SCAASGLIFR INSGGTRTYT LQMNSLRAED TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVDHKPSNTK FLGGPSVFLF VDVSDQEDPEV EQFNSTYRVV SNKGLPSSIE SQEEMTKNQV NGQPENNYKT KSRWQEGNVE
623	Легкий ланцюг Hu37D3-H9.v93 IgG4-S228P.YTE	EDLLTQSPSS HENGNTYLEW SGVPSRFSGS YYCFQGTLPV EIFFPPSDEQL VQWKVDNALQ SSTLTLSKAD TKSFNRGEC	LSASVGDRTV YQQRPGKSPK GSGTDFTLTI WTFGQGTKVE KSGTASVVCL SGNSQESVTE YEKHKVYACE	ITCRSSQSIIV LLIYKVSNNRF SSLPEDFAT IKETVAAPSV LNNFYFREAK QDSKSDSTYSL VTHQGLSSPV
624	Залишки 2-24 тау-білка	AEPFQEFVEMEDHAGTYGLGDRK		

	людини	
--	--------	--

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, де антитіло містить HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 605; HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 606; і HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 607; HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 608; HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 609; і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність
- 10 SEQ ID NO: 610.
2. Антитіло за п. 1, де антитіло зв'язується з мономерним тау-білком, олігомерним тау-білком, нефосфорилованим тау-білком і фосфорилованим тау-білком.
3. Антитіло за п. 1 або 2, де антитіло зв'язується з епітопом в області амінокислот 2-24 зрілого тау-білка людини.
- 15 4. Виділене антитіло за будь-яким із пп. 1-3, яке являє собою моноклональне антитіло.
5. Виділене антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, яке являє собою гуманізоване або химерне антитіло.
6. Антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, яке являє собою фрагмент антитіла, що зв'язує тау-білок людини.
- 20 7. Антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де тау-білок людини містить послідовність SEQ ID NO: 2.
8. Антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де антитіло містить:
 - a) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO: 603;
 - 25 b) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO: 604;
 - c) VH згідно з варіантом (a) і VL згідно з варіантом (b);
 - d) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO: 614;
 - 30 e) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO: 615;
 - f) VH згідно з варіантом (d) і VL згідно з варіантом (e);
 - g) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO: 619;
 - 35 h) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична SEQ ID NO: 620;
 - i) VH згідно з варіантом (g) і VL згідно з варіантом (h).
9. Антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де антитіло містить:
 - a) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить SEQ ID NO: 603;
 - 40 b) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить SEQ ID NO: 604;
 - c) VH згідно з варіантом (a) і VL згідно з варіантом (b);
 - d) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить послідовність SEQ ID NO: 614;
 - e) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить послідовність SEQ ID NO: 615;
 - f) VH згідно з варіантом (d) і VL згідно з варіантом (e);
 - 45 g) варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить послідовність SEQ ID NO: 619;
 - h) варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить послідовність SEQ ID NO: 620;
 - i) VH згідно з варіантом (g) і VL згідно з варіантом (h).
10. Виділене антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність, яка вибрана з SEQ ID NO: 603, 614 і 619; і
- 50 варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність, яка вибрана з SEQ ID NO: 604, 615 і 620.
11. Виділене антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність, яка вибрана з SEQ ID NO: 603, 614 і 619; і
- 55 варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність, яка вибрана з SEQ ID NO: 604, 615 і 620.
12. Виділене антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність, яка вибрана з SEQ ID NO: 603, 614 і 619; і
- варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність, яка вибрана з SEQ ID NO: 604, 615 і 620.

- [illegible]

- а) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 611 або SEQ ID NO: 612, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 613;
- б) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 616 або SEQ ID NO: 617, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 618; або
- 5 с) важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 621 або SEQ ID NO: 622, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 623.
18. Виділене антитіло, яке зв'язується з тау-білком людини, де антитіло містить:
- а) важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 611 або SEQ ID NO: 612, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 613;
- 10 б) важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 616 або SEQ ID NO: 617, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 618; або
- с) важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 621 або SEQ ID NO: 622, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 623.
19. Виділене антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де антитіло являє собою антитіло IgG1 або IgG4.
- 15 20. Виділене антитіло за п. 19, де антитіло являє собою антитіло IgG4.
21. Виділене антитіло за п. 20, де антитіло містить мутації M252Y, S254T і T256E.
22. Виділене антитіло за п. 20 або 21, де антитіло містить мутацію S228P.
23. Виділене антитіло за будь-яким із пп. 1-15 і 19-22, яке являє собою фрагмент антитіла.
- 20 24. Виділене антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де антитіло зв'язується з кожним з мономерного тау-білка, фосфорилизованого тау-білка, нефосфорилизованого тау-білка й олігомерного тау-білка з K_D менше ніж 100 нМ, менше ніж 75 нМ, менше ніж 50 нМ, менше ніж 10 нМ, менше ніж 5 нМ або менше ніж 1 нМ.
- 25 25. Виділене антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де антитіло зв'язується з мономерним тау-білком людини з K_D менше ніж 1 нМ.
26. Виділене антитіло за п. 24 або 25, де K_D визначений поверхневим плазмонним резонансом при 37 °C.
27. Виділене антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, яке зв'язує тау-білок яванського макака.
- 30 28. Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло за будь-яким із попередніх пунктів.
29. Клітина-хазяїн, що містить нуклеїнову кислоту за п. 28.
30. Спосіб одержання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна за п. 29 в умовах, що підходять для продукування зазначеного антитіла.
31. Імунокон'югат, що містить виділене антитіло за будь-яким із пп. 1-27 і другий терапевтичний агент.
- 35 32. Мічене антитіло, що містить антитіло за будь-яким із пп. 1-27 і детектовану мітку.
33. Фармацевтична композиція, яка містить виділене антитіло за будь-яким із пп. 1-27 і фармацевтично прийнятний носій.
34. Спосіб лікування захворювання, асоційованого з тау-білком, який включає введення індивіду із захворюванням, пов'язаним з тау-білком, антитіла за будь-яким із пп. 1-27 або фармацевтичної композиції за п. 33.
- 40 35. Спосіб за п. 34, де захворювання, асоційоване з тау-білком, являє собою таупатію.
36. Спосіб за п. 35, де таупатія являє собою нейродегенеративну таупатію.
37. Спосіб за п. 34 або 35, де таупатія вибрана з хвороби Альцгеймера, бічного аміотрофічного склерозу, хвороби Паркінсона, хвороби Крейтцфельда-Якоба, деменції боксерів, синдрому Дауна, хвороби Герстманна-Штреуслера-Шейнкера, міозиту з включеними тільцями, пріон-протеїнцеребральної амілоїдної ангіопатії, черепно-мозкової травми, бічного аміотрофічного склерозу/комбінації паркінсонізму та деменції (комплексу Гуама), негуамської хвороби рухового нейрона з нейрофібрилярними клубками, деменції аргірофільних зерен, кортикобазальної дегенерації, дифузійних нейрофібрилярних клубків з кальцифікацією, лобово-скроневої деменції, лобово-скроневої деменції з паркінсонізмом, зчепленої з 17 хромосомою, хвороби Галервордена-Шпатца, множинної системної атрофії, хвороби Німанна-Піка типу С, палідопonto-нігральної дегенерації, хвороби Піка, прогресуючого субкортикального гліозу, прогресуючого над'ядерного паралічу, підгострого склерозуючого паненцефаліту, деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, постенцефалітичного паркінсонізму та міотонічної дистрофії.
- 50 38. Спосіб за будь-яким із пп. 35-37, де таупатія являє собою хворобу Альцгеймера або прогресуючий над'ядерний параліч.
- 55

39. Спосіб збереження або підвищення ємності когнітивної пам'яті або вповільнення втрати пам'яті в індивіда, який включає введення антитіла за будь-яким із пп. 1-27 або фармацевтичної композиції за п. 33.
- 5 40. Спосіб зниження рівня тау-білка, нефосфорилованого тау-білка, фосфорилованого тау-білка або гіперфосфорилованого тау-білка в індивіда, який включає введення антитіла за будь-яким із пп. 1-27 або фармацевтичної композиції за п. 33.
41. Спосіб за будь-яким із пп. 34-40, де спосіб включає введення щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу.
42. Спосіб за п. 41, де додатковий терапевтичний засіб вибраний з неврологічних лікарських засобів, кортикостероїдів, антибіотиків, противірусних агентів, антитіл проти тау-білка, інгібіторів тау-білка, антитіл проти бета-амілоїду, інгібіторів агрегації бета-амілоїду, антитіл проти BACE1, інгібіторів BACE1, інгібіторів холінестерази (ChEI), антагоніста рецептора NDMA і харчової добавки.
- 10 43. Спосіб за п. 42, де ChEI являє собою такрин, ривастигмін, донепезил або галантамін; і де антагоніст рецептора NMDA являє собою мемантин.
44. Спосіб за п. 43, де антитіло проти бета-амілоїду являє собою кренезумаб.
45. Виділене антитіло за будь-яким із пп. 1-27 для застосування як лікарського засобу.
46. Виділене антитіло за будь-яким із пп. 1-27 для застосування при лікуванні таупатії в індивіда.
- 20 47. Виділене антитіло за п. 46, де таупатія являє собою нейродегенеративну таупатію.
48. Виділене антитіло за п. 46 або 47, де таупатія вибрана з хвороби Альцгеймера, бічного аміотрофічного склерозу, хвороби Паркінсона, хвороби Крейтцфельда-Якоба, деменції боксерів, синдрому Дауна, хвороби Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозиту з включеними тільцями, пріон-протеїнцеребральної амілоїдної ангіопатії, черепно-мозкової травми, бічного аміотрофічного склерозу/комбінації паркінсонізму та деменції (комплексу Гуама), негуамської хвороби рухового нейрона з нейрофібрилярними клубками, деменції аргірофільних зерен, кортикобазальної дегенерації, дифузійних нейрофібрилярних клубків з кальцифікацією, лобово-скроневої деменції, лобово-скроневої деменції з паркінсонізмом, зчепленої з 17 хромосомою, хвороби Галервордена-Шпатца, множинної системної атрофії, хвороби Німанна-Піка типу С, палідо-пonto-нігральної дегенерації, хвороби Піка, прогресуючого субкортикального гліозу, прогресуючого над'ядерного паралічу, підгострого склерозуючого паненцефаліту, деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, постенцефалітичного паркінсонізму та міотонічної дистрофії.
- 25 49. Виділене антитіло за будь-яким із пп. 46-48, де таупатія являє собою хворобу Альцгеймера або прогресуючий над'ядерний параліч.
- 30 50. Виділене антитіло за будь-яким із пп. 1-27 для застосування при збереженні або підвищенні ємності когнітивної пам'яті або вповільненні втрати пам'яті в індивіда.
51. Виділене антитіло за будь-яким із пп. 1-27 для застосування при зниженні рівня тау-білка, фосфорилованого тау-білка, нефосфорилованого тау-білка або гіперфосфорилованого тау-білка в індивіда.
- 40 52. Виділене антитіло за будь-яким із пп. 46-51, де антитіло призначене для застосування з щонайменше одним додатковим терапевтичним засобом.
53. Виділене антитіло за п. 52, де додатковий терапевтичний засіб вибраний з неврологічних лікарських засобів, кортикостероїдів, антибіотиків, противірусних агентів, антитіл проти тау-білка, антитіл проти бета-амілоїду, антитіл проти BACE1, інгібіторів BACE1, інгібіторів холінестерази (ChEI), антагоніста рецептора NDMA і харчової добавки.
- 45 54. Виділене антитіло за п. 53, де ChEI являє собою такрин, ривастигмін, донепезил або галантамін; і де антагоніст рецептора NMDA являє собою мемантин.
55. Виділене антитіло за п. 53, де антитіло проти бета-амілоїду являє собою кренезумаб.
- 50 56. Застосування антитіла за будь-яким із пп. 1-27 для одержання лікарського засобу для лікування захворювання, асоційованого з тау-білком, в індивіда.
57. Застосування за п. 56, де захворювання, асоційоване з тау-білком, являє собою таупатію.
58. Застосування за п. 57, де таупатія являє собою нейродегенеративну таупатію.
59. Застосування за п. 57 або 58, де таупатія вибрана з хвороби Альцгеймера, бічного аміотрофічного склерозу, хвороби Паркінсона, хвороби Крейтцфельда-Якоба, деменції боксерів, синдрому Дауна, хвороби Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозиту з включеними тільцями, пріон-протеїнцеребральної амілоїдної ангіопатії, черепно-мозкової травми, бічного аміотрофічного склерозу/комбінації паркінсонізму та деменції (комплексу Гуама), негуамської хвороби рухового нейрона з нейрофібрилярними клубками, деменції аргірофільних зерен, кортикобазальної дегенерації, дифузійних нейрофібрилярних клубків з кальцифікацією, лобово-
- 60

скроневої деменції, лобово-скроневої деменції з паркінсонізмом, зчепленої з 17 хромосою, хвороби Галервордена-Шпатца, множинної системної атрофії, хвороби Німанна-Піка типу С, палідо-пonto-нігральної дегенерації, хвороби Піка, прогресуючого субкортикального гліозу, прогресуючого над'ядерного паралічу, підгострого склерозуючого паненцефаліту, деменції з перевагою нейрофібрилярних клубків, постенцефалітичного паркінсонізму та міотонічної дистрофії.

60. Застосування за будь-яким із пп. 57-59, де таупатія являє собою хворобу Альцгеймера або прогресуючий над'ядерний параліч.

61. Застосування антитіла за будь-яким із пп. 1-27 для одержання лікарського засобу для збереження або підвищення ємності когнітивної пам'яті або вповільнення втрати пам'яті в індивіда.

62. Застосування за будь-яким із пп. 56-61, де лікарський засіб призначений для введення з щонайменше одним додатковим терапевтичним засобом.

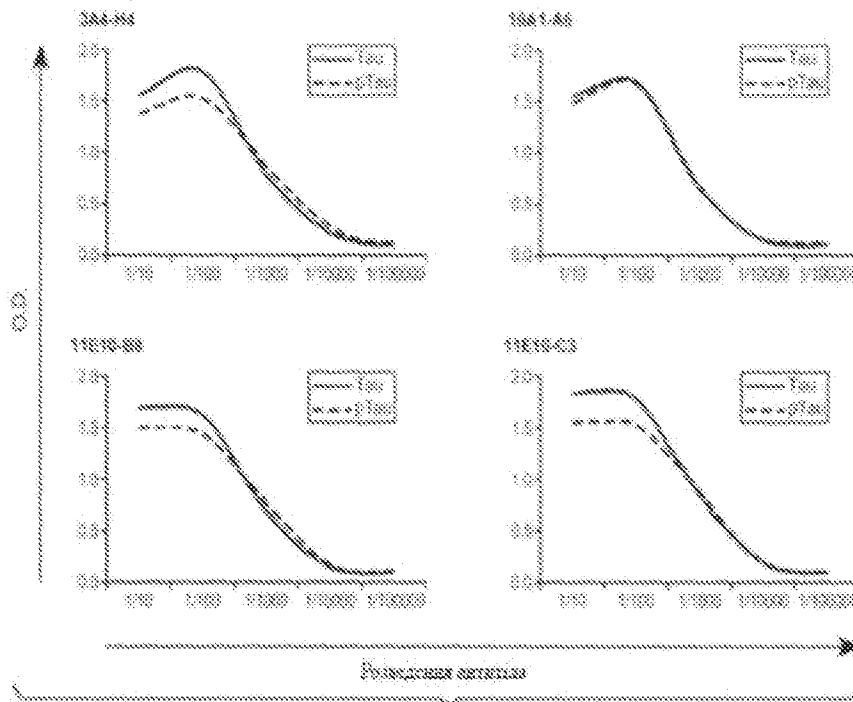
63. Застосування за п. 62, де зазначений додатковий терапевтичний засіб вибраний з неврологічних лікарських засобів, кортикостероїдів, антибіотиків, протівірусних агентів, антитіл проти тау-білка, антитіл проти бета-амілоїду, антитіл проти BACE1, інгібіторів BACE1, інгібіторів холінестерази (ChEI), антагоніста рецептора NDMA і харчової добавки.

64. Застосування за п. 63, де ChEI являє собою такрин, ривастигмін, донепезил або галантамін; і де антагоніст рецептора NDMA являє собою мемантин.

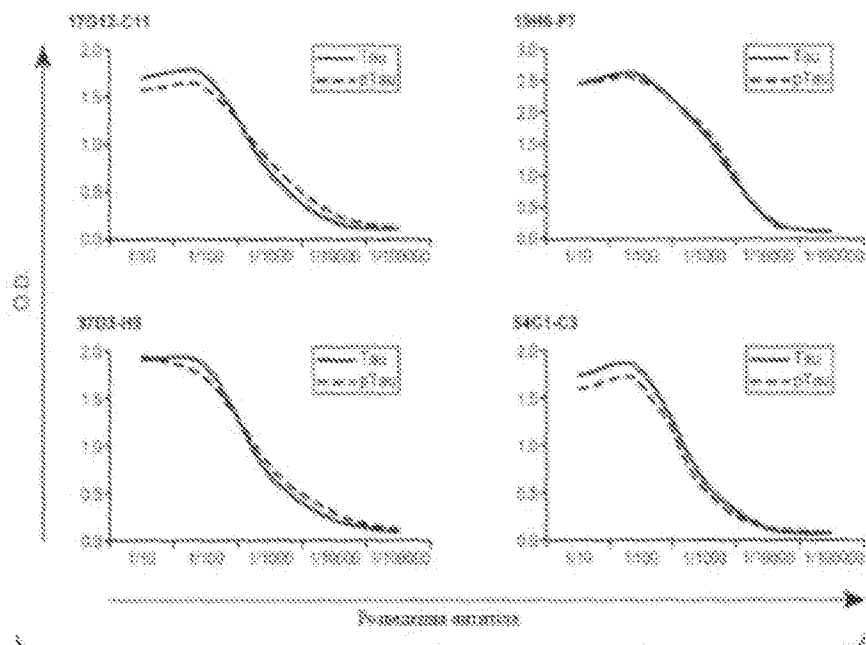
65. Застосування за п. 63, де антитіло проти бета-амілоїду являє собою кренезумаб.

66. Спосіб виявлення нейрофібрилярних клубків, нейропільних ниток або дистрофічних нейритів, який включає приведення в контакт зразка з антитілом за будь-яким із пп. 1-27.

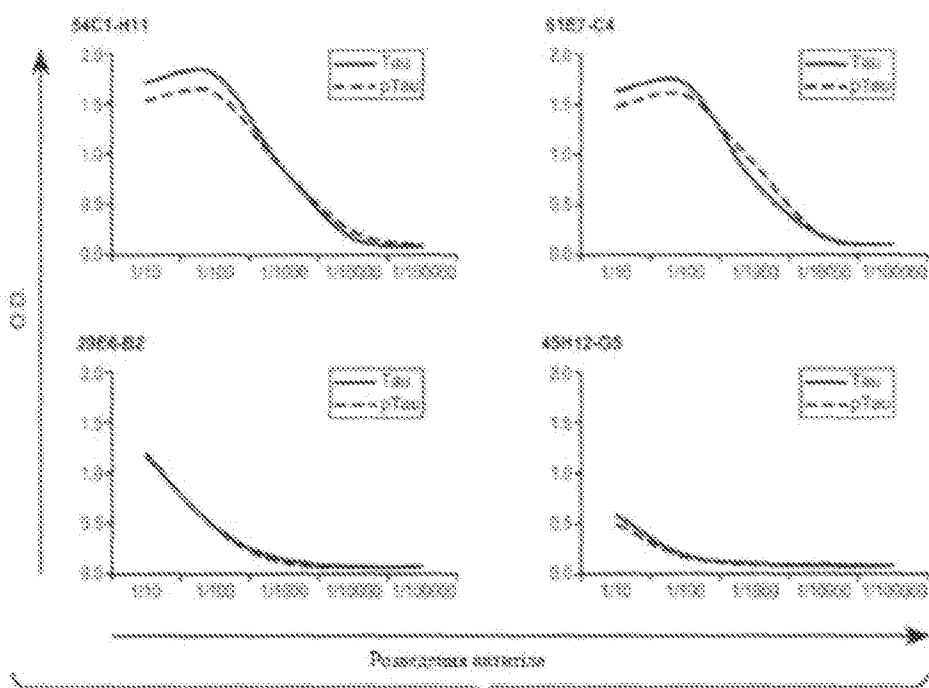
67. Спосіб за п. 66, де зразок являє собою зразок головного мозку, зразок цереброспинальної рідини або зразок крові.



Фіг. 1А



Фиг. 1B



Фиг. 1C

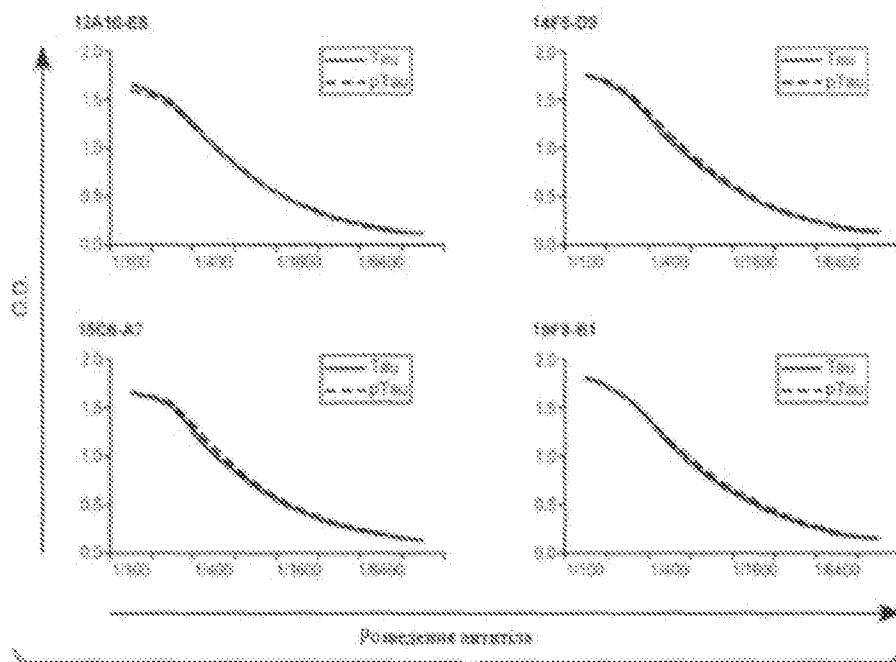


Fig. 1D

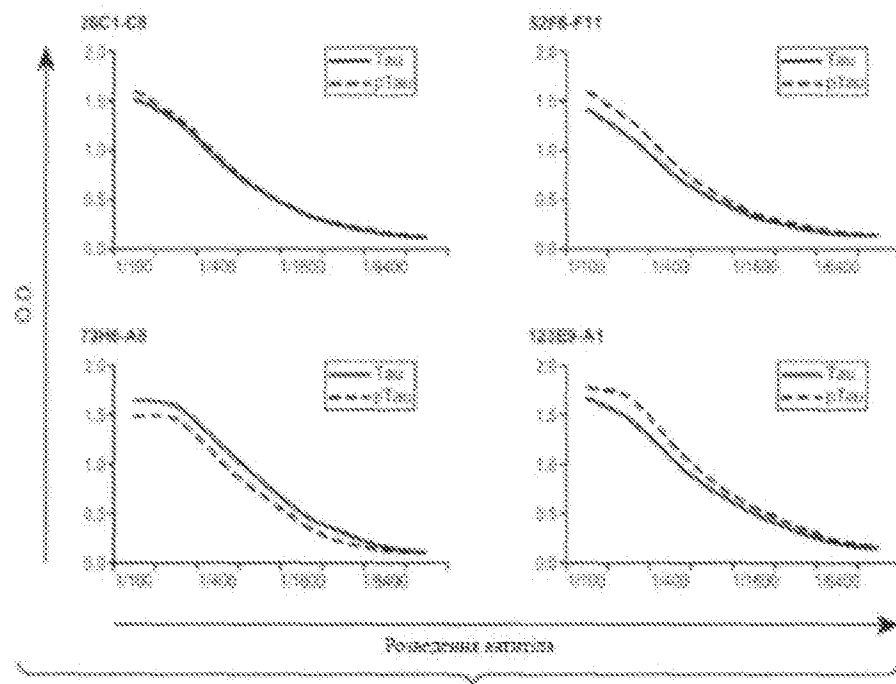


Fig. 1E

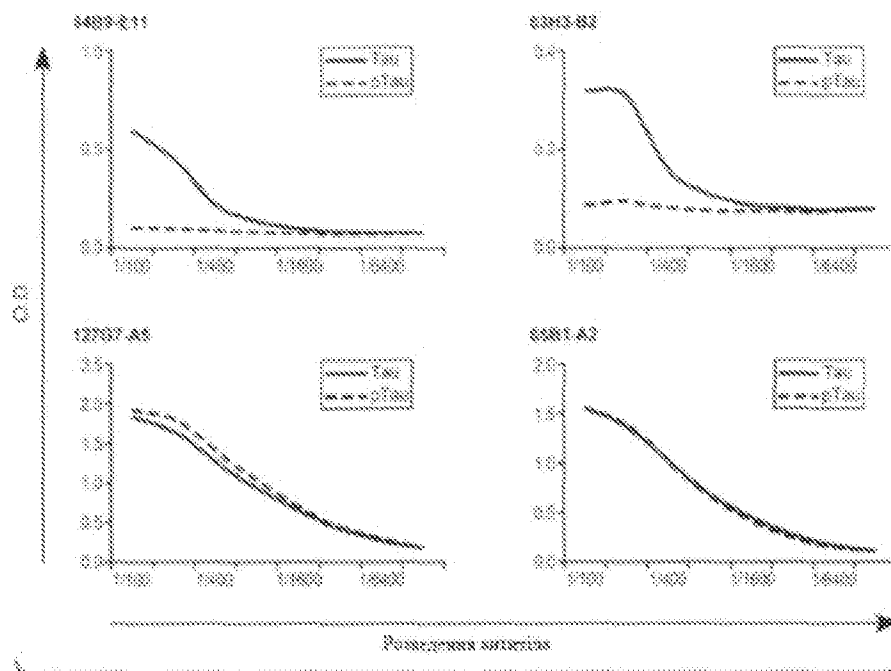


Fig. 1F

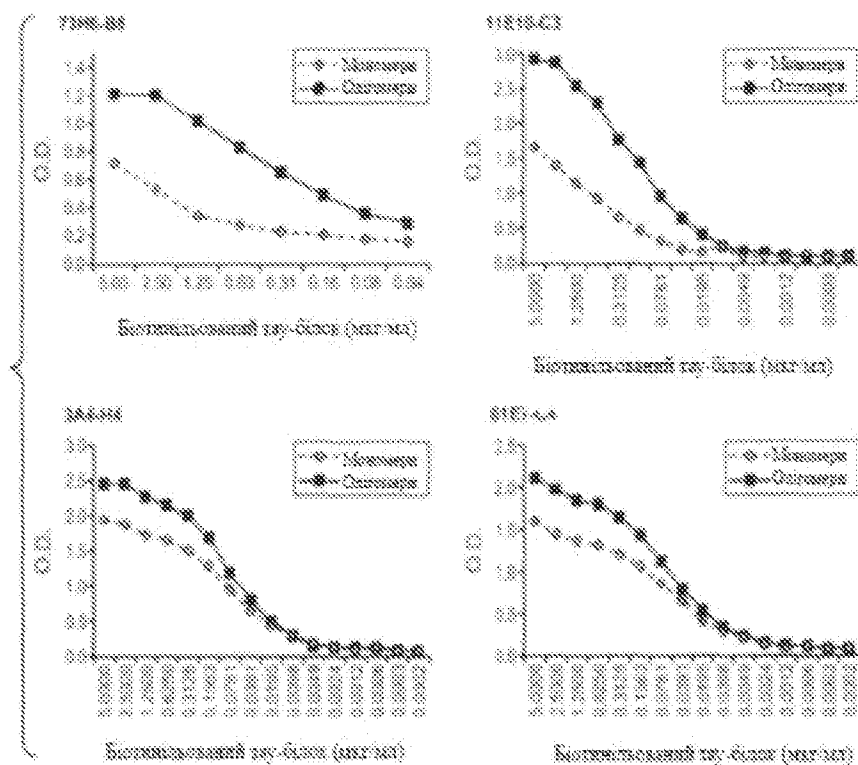
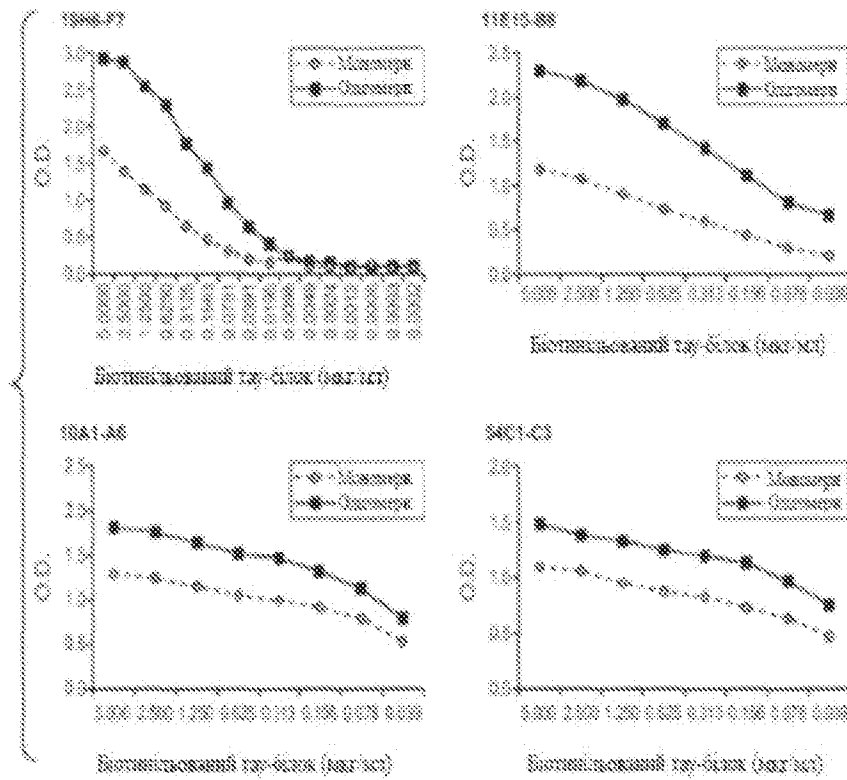
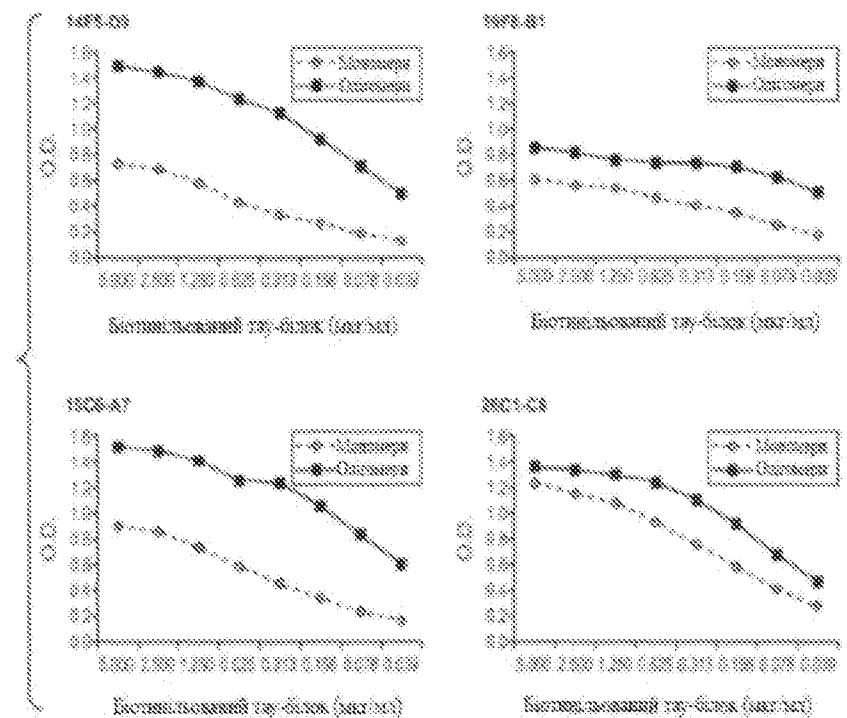


Fig. 2A



Фіг. 2В



Фіг. 2С

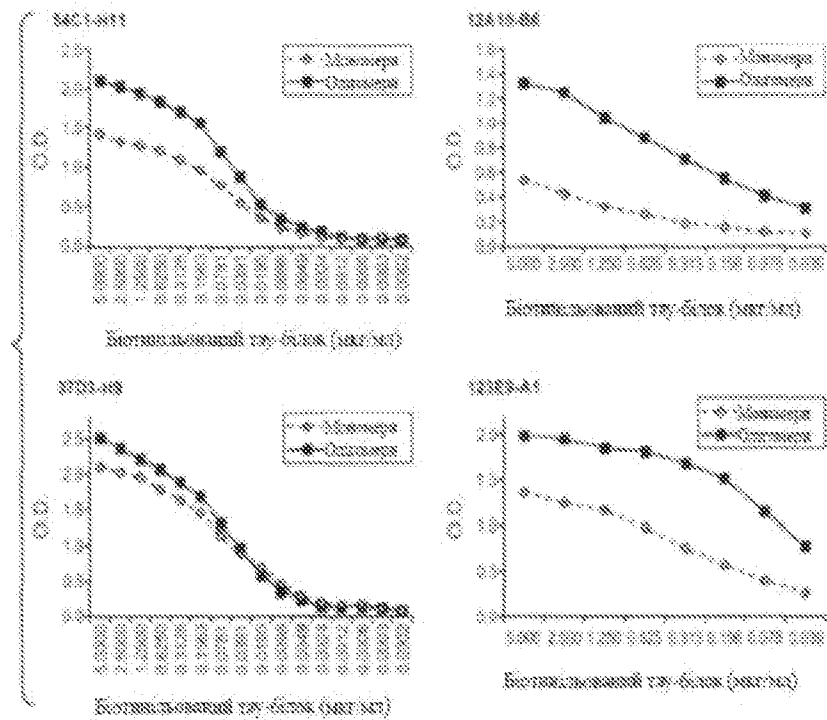


Fig. 2D

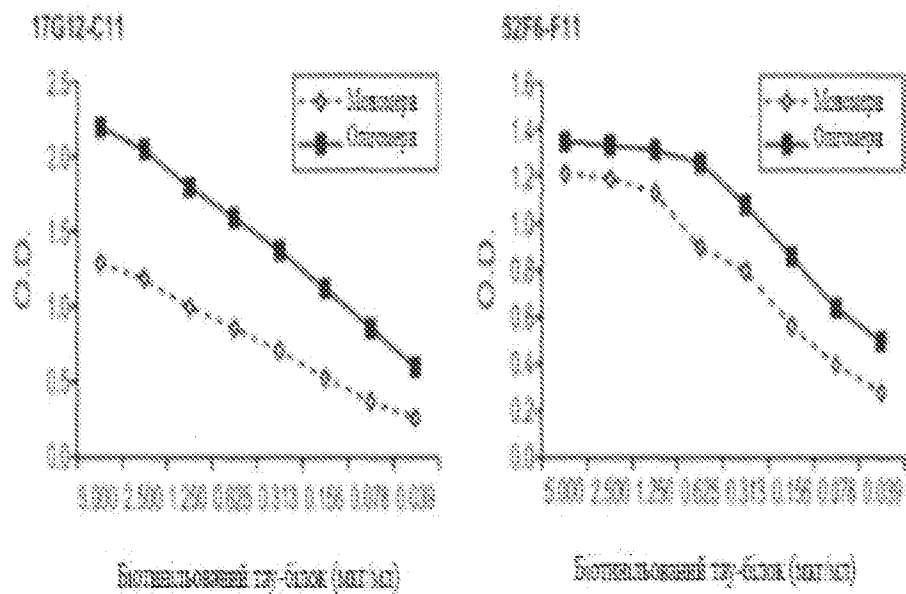
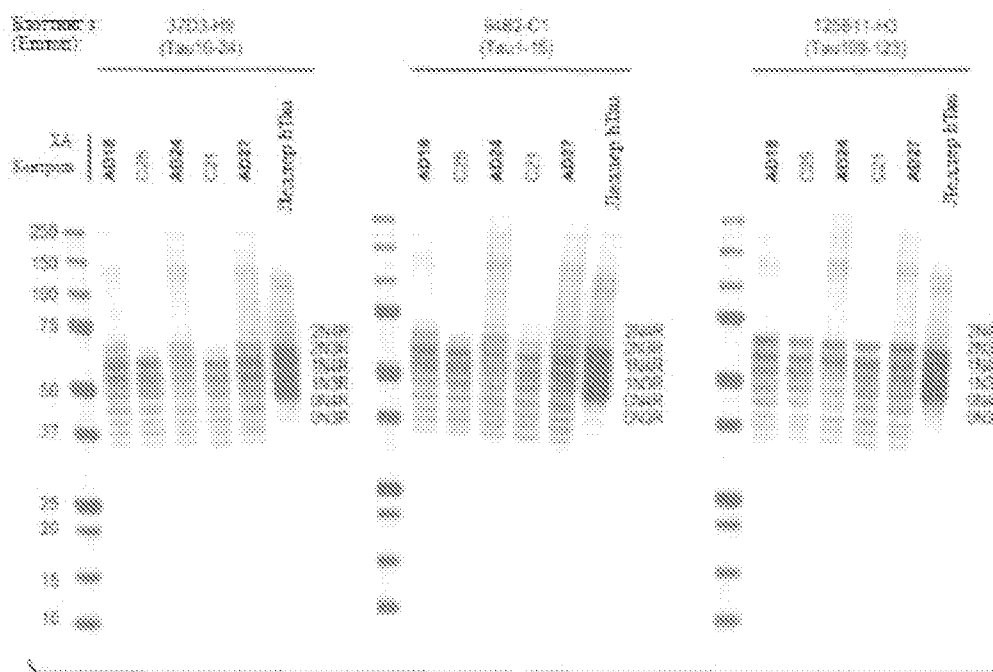


Fig. 2E



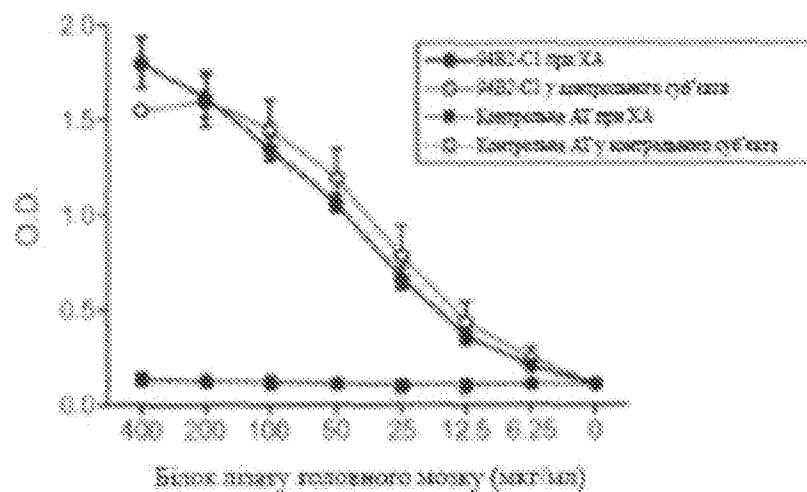


Fig. 4B

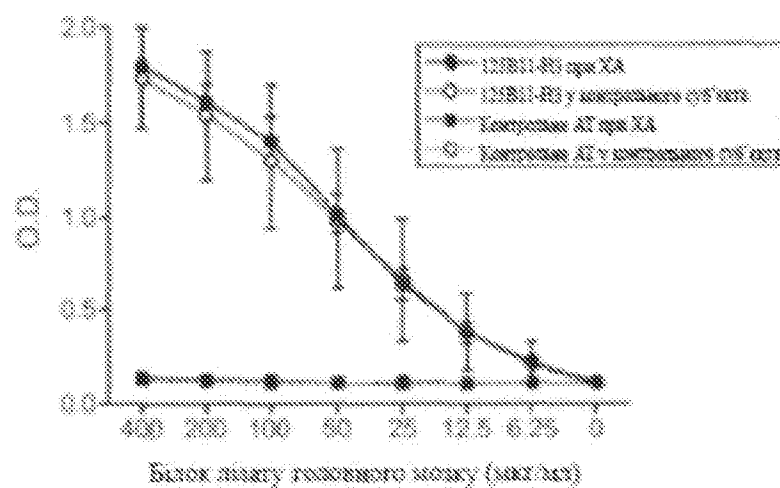


Fig. 4C

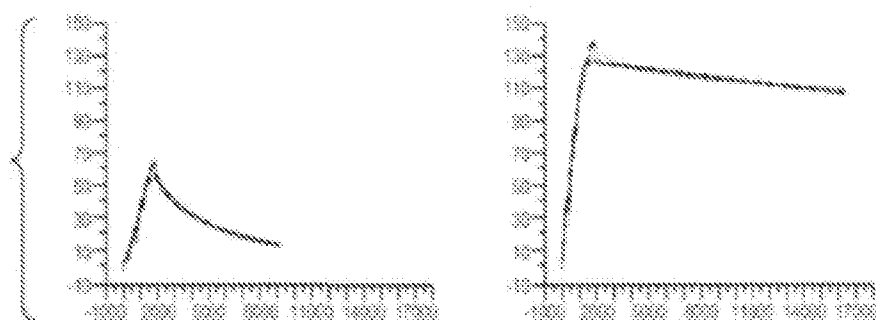


Fig. 5

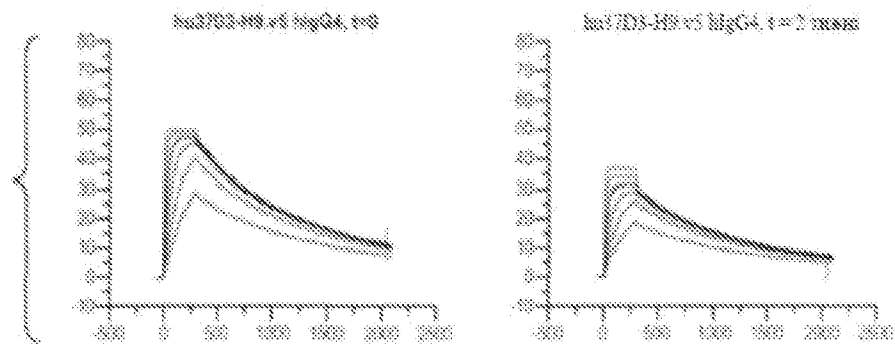
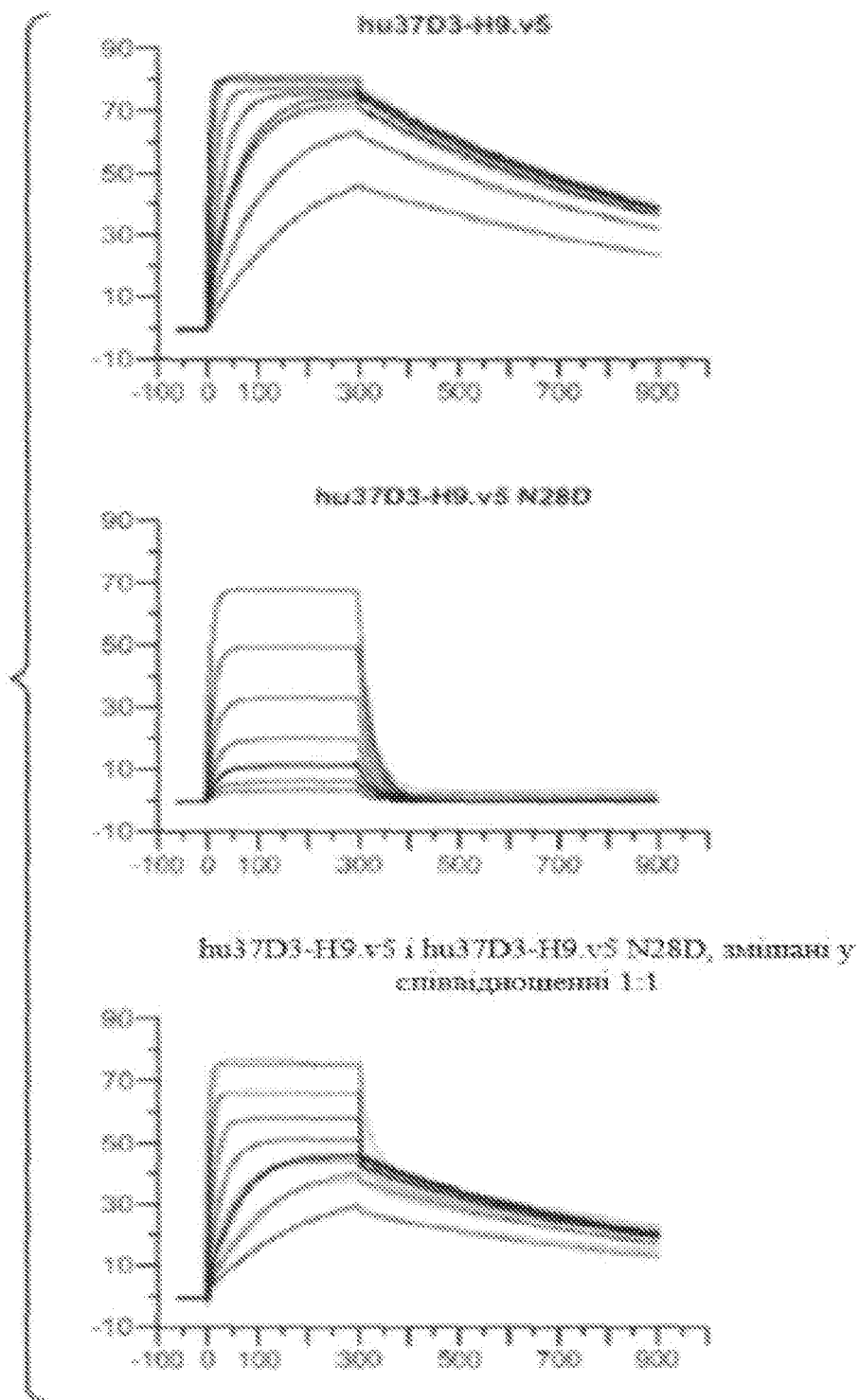


Fig. 6



Фиг. 7

Адрес	ЭД (мл)	Измер. стабильности	М ₁ = 10% Р ₁ max выраженный в Кален (из-за-густоты) = 0.17	Адреса %1, у которых не (адреса в Кален)	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16														ЭД (мл)
					Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			
Календарь (из-за-густоты) (из-за-густоты) = 0.17	1.8	88%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			360
h ₀ 3703-408-40	0.9	75%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			361
h ₀ 3703-408-40.1	4.0	72%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			362
h ₀ 3703-408-40.2	10.9	87%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			363
h ₀ 3703-408-40.3	73.2	70%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			364
h ₀ 3703-408-40.4	30.1	78%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			365
h ₀ 3703-408-40.5	64.5	75%	-		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			366
h ₀ 3703-408-40.6	30.8	87%	-		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			367
h ₀ 3703-408-40.7	13.0	87%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			368
h ₀ 3703-408-40.8	2.2	90%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			369
h ₀ 3703-408-40.9	5.3	88%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			370
h ₀ 3703-408-40.10	4.7	78%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			371
h ₀ 3703-408-40.11	87.7	71%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			372
h ₀ 3703-408	5.3	78%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			373
h ₀ 3703-408-A0	32.5	70%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			374
h ₀ 3703-408-A4	1.2	88%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			375
h ₀ 3703-408-A6	38.3	89%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			376
h ₀ 3703-408-A8	1.8	87%	Так		Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			377

Фиг. 8A

h ₀ 3703-408-A10	41.8	37%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			378
h ₀ 3703-408-A12	1.8	88%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			379
h ₀ 3703-408-A14	51.4	70%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			380
h ₀ 3703-408-A16	0.9	88%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			381
h ₀ 3703-408-A18	17.3	83%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			382
h ₀ 3703-408-A20	7.1	90%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			383
h ₀ 3703-408-A22	27.8	70%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			384
h ₀ 3703-408-A24	4.7	88%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			385
h ₀ 3703-408-A26	22.5	78%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			386
h ₀ 3703-408-A28	11.4	89%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			387
h ₀ 3703-408-A30	34.4	77%	-	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			388
h ₀ 3703-408-B1	28.3	101%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			389
h ₀ 3703-408-B2	31.8	83%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			390
h ₀ 3703-408-B3	0.4	258%	-	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			391
h ₀ 3703-408-B4	10.5	288%	-	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			392
h ₀ 3703-408-B6	85.5	48%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			393
h ₀ 3703-408-B7	4.1	887%	-	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			394
h ₀ 3703-408-B8	1.8	458%	-	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			395
h ₀ 3703-408-C1	1.4	77%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			396
h ₀ 3703-408-C2	9.6	75%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			397
h ₀ 3703-408-D1	5.7	73%	Так	Э	О	Л	Н	С	Н	О	Н	Т	Y	F	L			398

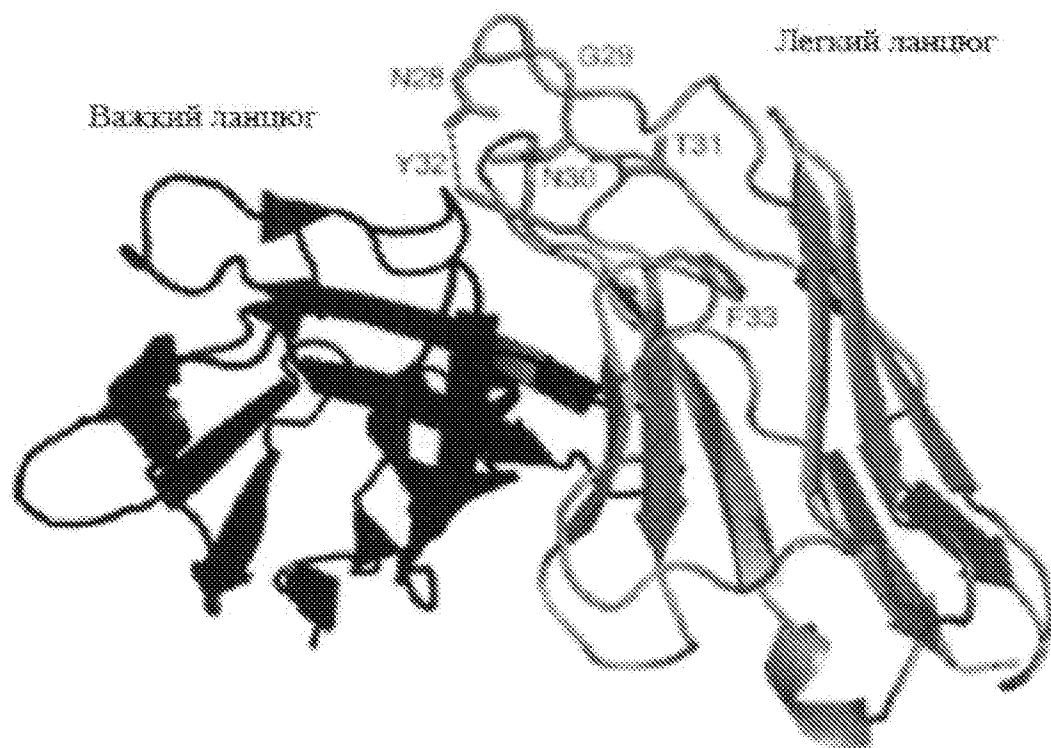
Фиг. 8B

Астроизме	ICD (add)	Access coefficients	No.1 < 10% Error i reproducible Rows (no copy) > 0.17	Sequence VL y subsequence access (sequence in Katal)														Seq ID
				1	2	3	4	230	235	28	29	30	31	32	33	34		
Lowercase for access (sequence a = 9)	1.8	100%	Yes	E	S	L	N	S	N	S	N	T	Y	F	L	389		
hu37C3.v28.E1	25.1	48%	Yes	D	O	L	N	S	N	S	N	T	Y	F	L	390		
hu37C3.v28.E2	22.3	38%	Yes	D	O	L	S	N	S	N	T	Y	F	L		391		
hu37C3.v28.E3	1.1	364%	-	D	O	L	S	N	S	N	T	Y	F	L		392		
hu37C3.v28.F1	2.1	81%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L			393		
hu37C3.v28.F2	1.9	51%	Yes	D	O	L	H	T	N	S	N	T	Y	F	L	394		
hu37C3.v28.F3	8.5	70%	Yes	D	O	L	H	T	N	A	N	T	Y	F	L	395		
hu37C3.v28.F4	35.8	74%	-	E	O	L	H	S	N	S	N	T	Y	F	L	396		
hu37C3.v28.F5	17.8	80%	Yes	E	O	L	H	S	K	O	N	T	Y	F	L	397		
hu37C3.v28.F6	32.8	78%	Yes	E	O	L	H	S	N	S	N	T	Y	F	L	398		
hu37C3.v28.F4	24.8	82%	Yes	E	O	L	H	S	L	O	N	T	Y	F	L	399		
hu37C3.v28.F5	2.8	82%	Yes	D	O	L	H	S	N	O	N	T	Y	F	L	400		
hu37C3.v28.F6	5.4	70%	Yes	D	O	L	H	S	N	Y	N	T	Y	F	L	401		
hu37C3.v28.F7	4.4	88%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	N	T	Y	F	L	402		
hu37C3.v29.1	13.5	70%	Yes	E	O	L	H	S	N	S	O	T	Y	F	L	403		
hu37C3.v29.2	2.8	89%	Yes	E	O	L	H	S	N	S	O	T	Y	F	L	404		
hu37C3.v29.3	5.8	93%	Yes	E	O	L	H	S	N	S	O	T	Y	F	L	405		
hu37C3.v29.4	4.9	79%	Yes	E	O	L	H	S	N	O	A	T	Y	F	L	406		
hu37C3.v29.5	1.4	64%	Yes	E	O	L	H	S	N	O	H	T	Y	F	L	407		
hu37C3.v29.6	1.4	62%	Yes	E	O	L	H	S	N	O	K	T	Y	F	L	408		
hu37C3.v29.7	4.8	90%	Yes	E	O	L	H	S	N	O	L	T	Y	F	L	409		
hu37C3.v29.8	45.3	77%	-	E	O	L	H	S	N	A	O	T	Y	F	L	410		
hu37C3.v29.9	7.3	88%	Yes	E	O	L	H	S	N	A	O	T	Y	F	L	411		
hu37C3.v29.10	17.4	100%	Yes	E	O	L	H	S	N	A	S	T	Y	F	L	412		

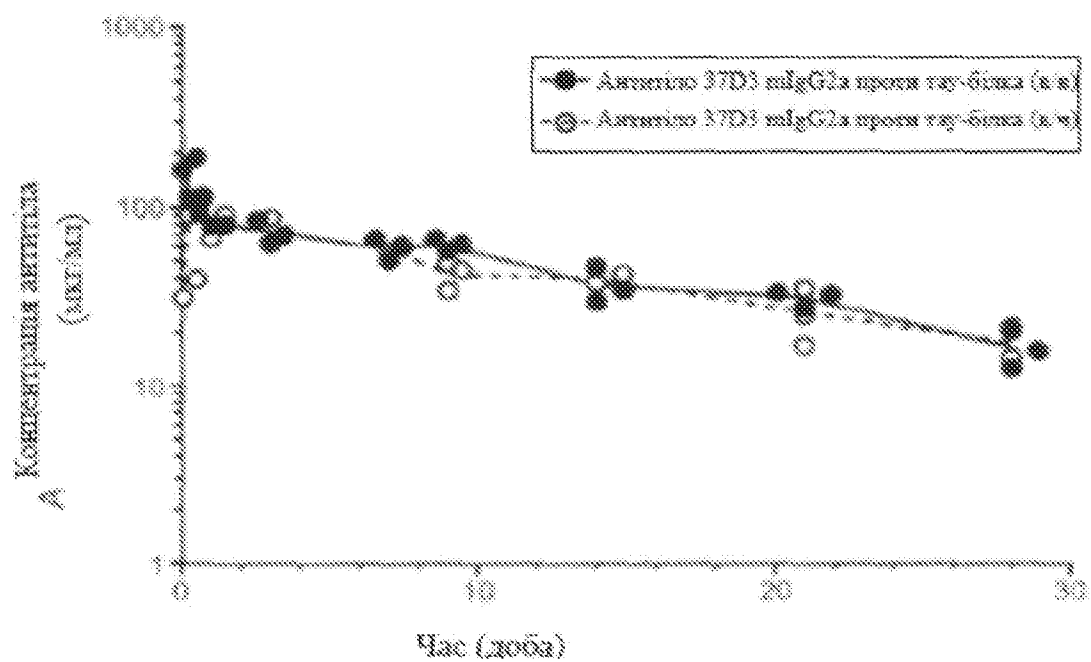
Фиг. 8C

hu37C3.v29.11	27.9	87%	Yes	E	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					413
hu37C3.v29.12	7.6	93%	Yes	E	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					414
hu37C3.v29.13	6.7	76%	Yes	E	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					415
hu37C3.v29.14	32.9	92%	Yes	E	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					416
hu37C3.v29.v29.1	23.9	87%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					417
hu37C3.v29.v29.2	4.2	98%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					418
hu37C3.v29.v29.3	38.1	83%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					419
hu37C3.v29.v29.4	22.0	87%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					420
hu37C3.v29.v29.5	35.1	80%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					421
hu37C3.v29.v29.6	19.1	970%	-	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					422
hu37C3.v29.v29.7	34.9	93%	-	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					423
hu37C3.v29.v29.8	31.4	100%	-	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					424
hu37C3.v29.v29.9	36.4	83%	-	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					425
hu37C3.v29.v29.10	16.1	84%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					426
hu37C3.v29.v31.1	20.9	95%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					427
hu37C3.v29.v31.2	41.2	72%	-	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					428
hu37C3.v29.v31.3	10.8	95%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					429
hu37C3.v29.v31.4	9.9	97%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					430
hu37C3.v29.v31.5	6.8	933%	-	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					431
hu37C3.v29.v31.6	15.2	85%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					432
hu37C3.v29.v31.8	15.5	86%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					433
hu37C3.v29.v31.7	6.9	83%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					434
hu37C3.v29.v31.9	10.9	78%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					435
hu37C3.v29.v31.8	7.5	81%	Yes	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					436
hu37C3.v29.v31.10	5.5	261%	-	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					437
hu37C3.v29.v31.11	23.7	126%	-	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					438
hu37C3.v29.v31.12	41.8	99%	-	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					439
hu37C3.v29.v31.13	48.1	83%	-	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					440
hu37C3.v29.v31.14	36.5	86%	-	D	O	L	H	S	N	T	Y	F	L					441

Фиг. 8D



Фиг. 9



Фиг. 10

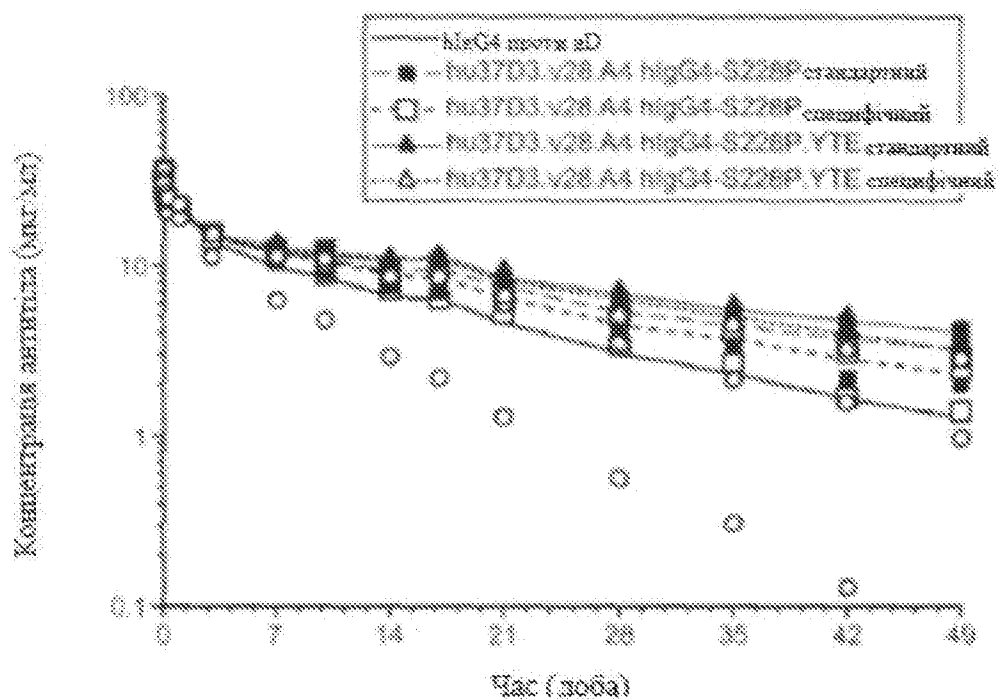


Fig. 11

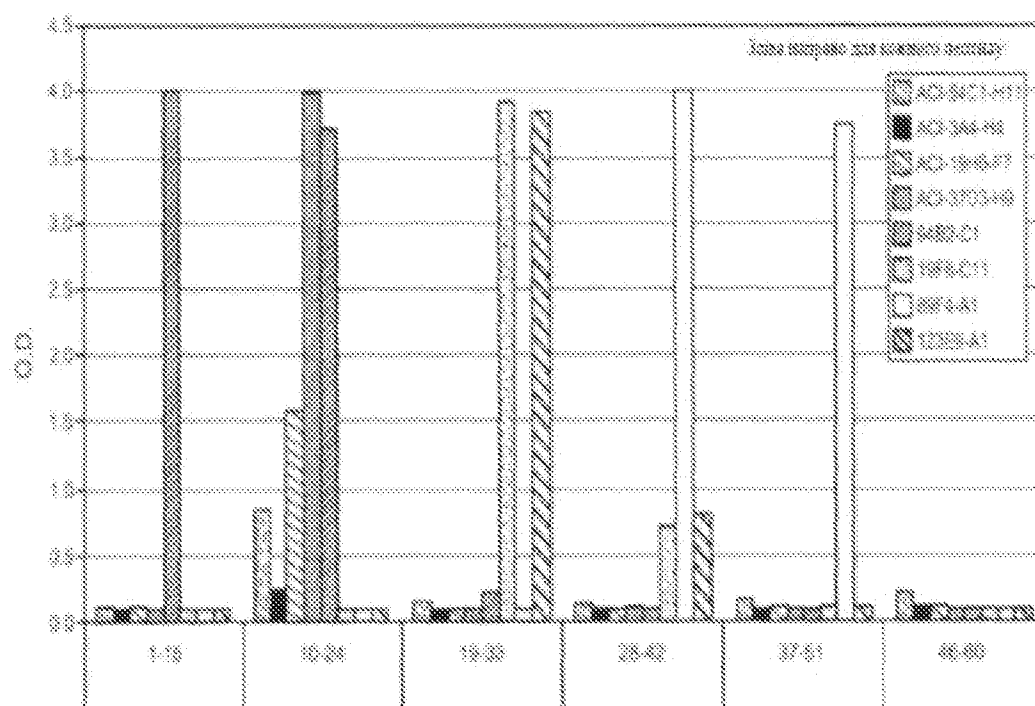


Fig. 12A

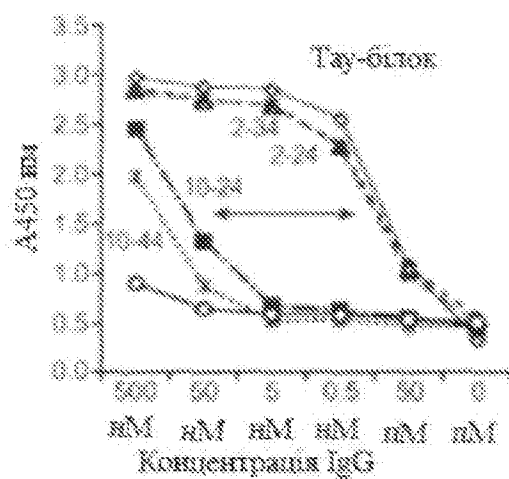


Fig. 12B

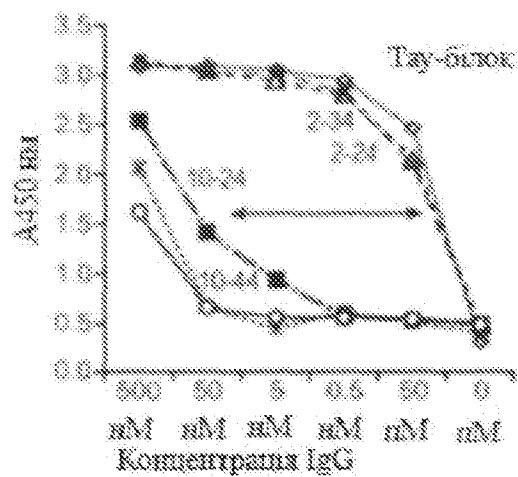
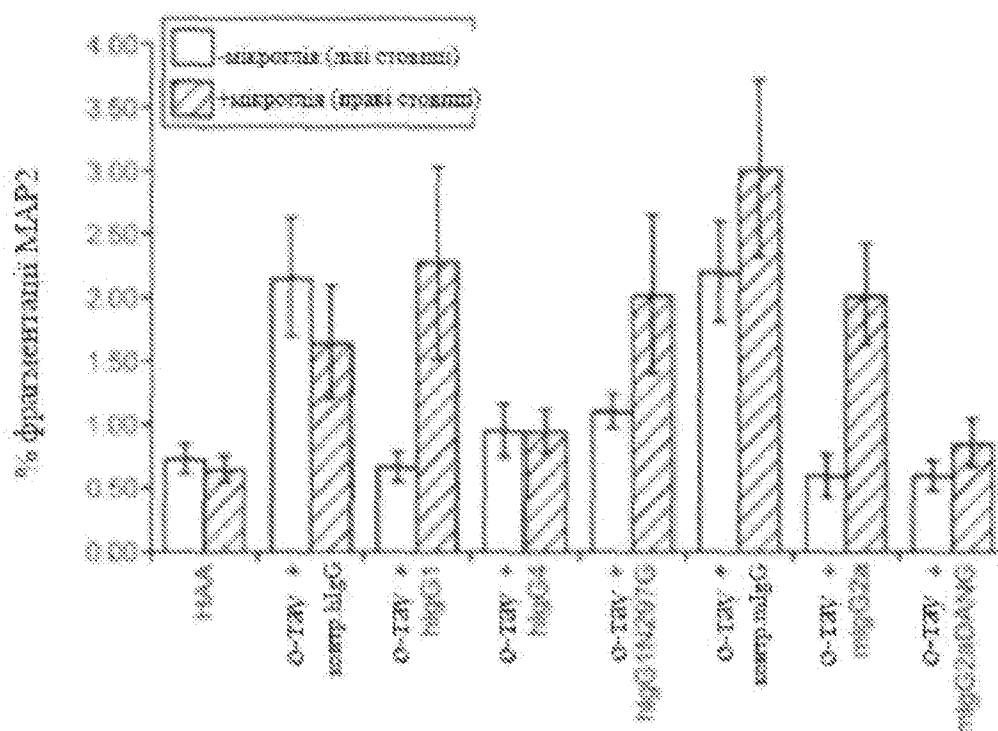
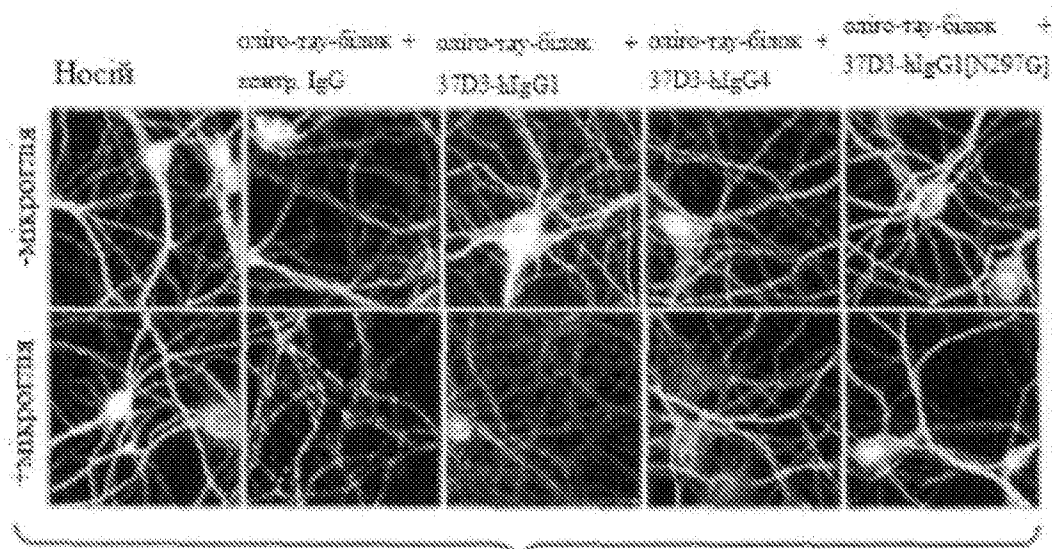


Fig. 12C

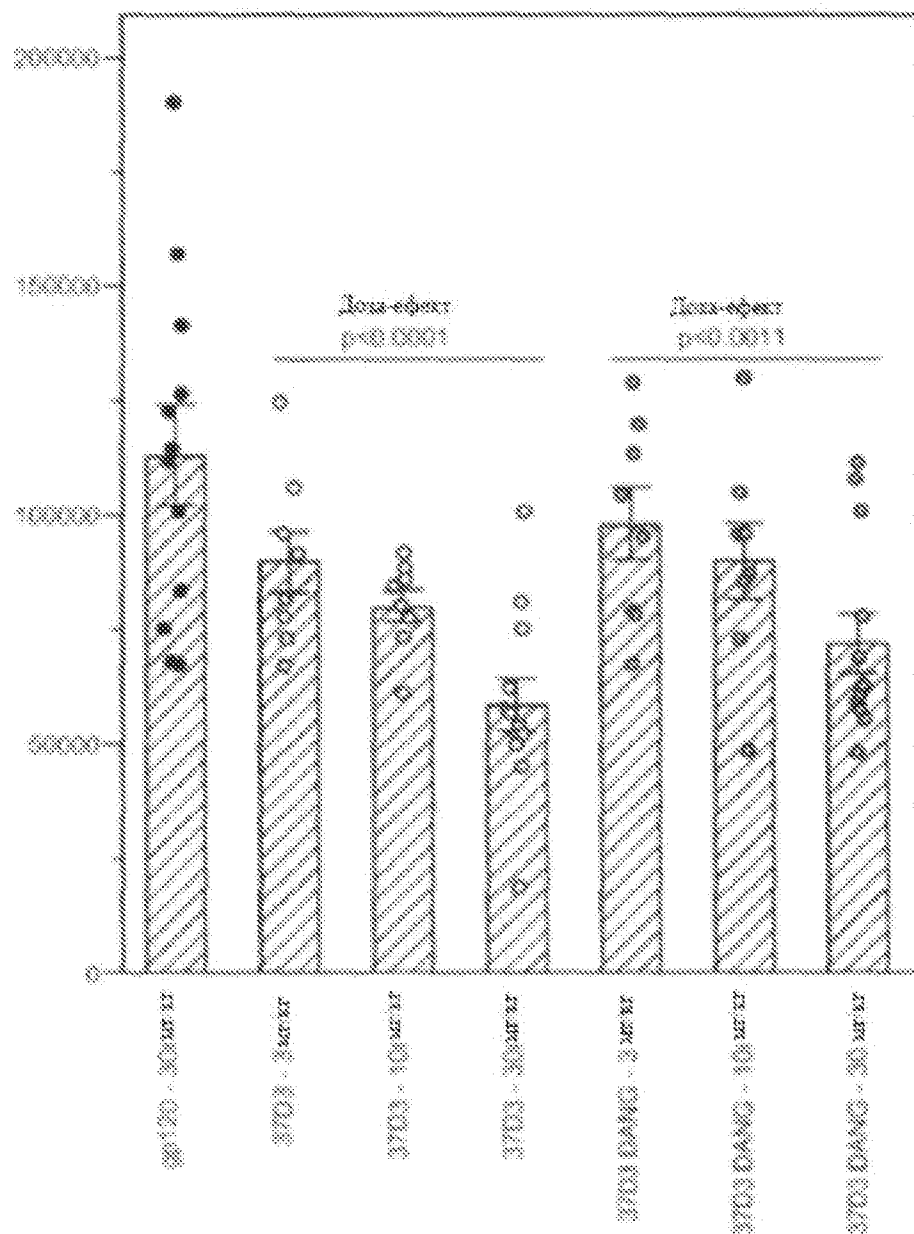


Фиг. 13А



Фиг. 13В

рТам 212/214, гіпноклит, комплексна ОЦ



Фиг. 14

Начало трансляции (арг-2000)
↓
Exon 37D3 (2.24)

```

PRO364486.HU 1 MHHHHHHHGGENLYFGGSAEPFGCEFFVMEGRAGTYGLGGRKDGCGTTNMLGGDQ 55
PRO376546.CYNO 1 MHHHHHHHGGENLYFGGSAEPFGCEFFVMEGRAGTYGLGGRKDGCGTTNMLGGDQ 55

PRO364486.HU 51 EGDYDAGLKEEPLOTNMEGCGSEHFGCSETSDANSTPTAEQVYAPLVQDQAP 100
PRO376546.CYNO 51 EGDYDAGLKEEPLOTNMEGCGSEHFGCSETSDANSTPTAEQVYAPLVQDQAP 100

PRO364486.HU 101 GFGCAAAQCPHGEIPEGTTAEZAGIGDTPGLEDEAAAGSVTCARNVSKSKDGT 150
PRO376546.CYNO 101 GFGCAAAQCPHGEIPEGTTAEZAGIGDTPGLEDEAAAGSVTCARNVSKSKDGT 150

PRO364486.HU 151 GSCDDEKAKGACGCKTKLATFPGCAAPFGCGGCGANATRIFAKTYFAPKTPFSS 200
PRO376546.CYNO 151 GSCDDEKAKGACGCKTKLATFPGCAAPFGCGGCGANATRIFAKTYFAPKTPFSS 200

PRO364486.HU 201 GEPFYKSGDRSGSYSGSPGSPGTFPGSRKSTPGLTTPFPAEYFKYAVVNTFPFKS 250
PRO376546.CYNO 201 GEPFYKSGDRSGSYSGSPGSPGTFPGSRKSTPGLTTPFPAEYFKYAVVNTFPFKS 250

PRO364486.HU 251 PSSAKERLQTAPYVPMFOLKENVKSKIGSTENLKHQFGGGRVQIINFKLDLS 300
PRO376546.CYNO 251 PSSAKERLQTAPYVPMFOLKENVKSKIGSTENLKHQFGGGRVQIINFKLDLS 300

PRO364486.HU 301 NVQSRCSGSKDNIKRVPGCGGVQIVYKFPVOLSEVTEKCSGLGNHINNEPCCG 350
PRO376546.CYNO 301 NVQSRCSGSKDNIKRVPGCGGVQIVYKFPVOLSEVTEKCSGLGNHINNEPCCG 350

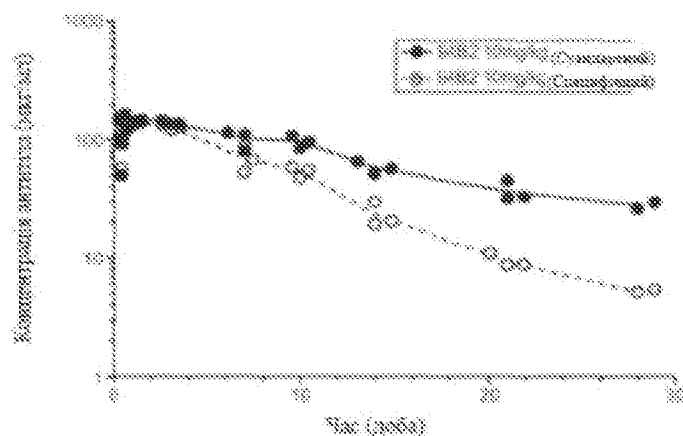
PRO364486.HU 351 QVEYKSEELDFKDKVQSKIGLGNHITHVPGGGSKKIETHKLTTPRENAKAK 400
PRO376546.CYNO 351 QVEYKSEELDFKDKVQSKIGLGNHITHVPGGGSKKIETHKLTTPRENAKAK 400

PRO364486.HU 401 TDSGAEIVYKSPVVGDTSEPHLSNVSTGSDIDNVDSFQLATLACEVSAAS 450
PRO376546.CYNO 401 TDSGAEIVYKSPVVGDTSEPHLSNVSTGSDIDNVDSFQLATLACEVSAAS 450

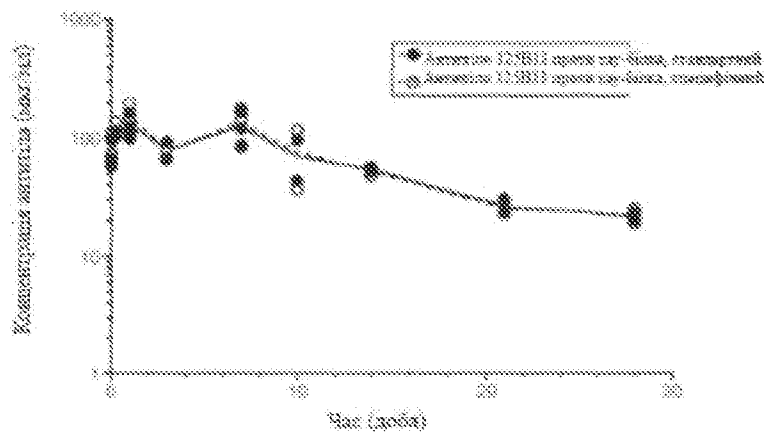
PRO364486.HU 451 LAKQGL 458 SEQ ID NO 1
PRO376546.CYNO 451 LAKQGL 458 SEQ ID NO 2

```

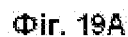
Фиг. 15

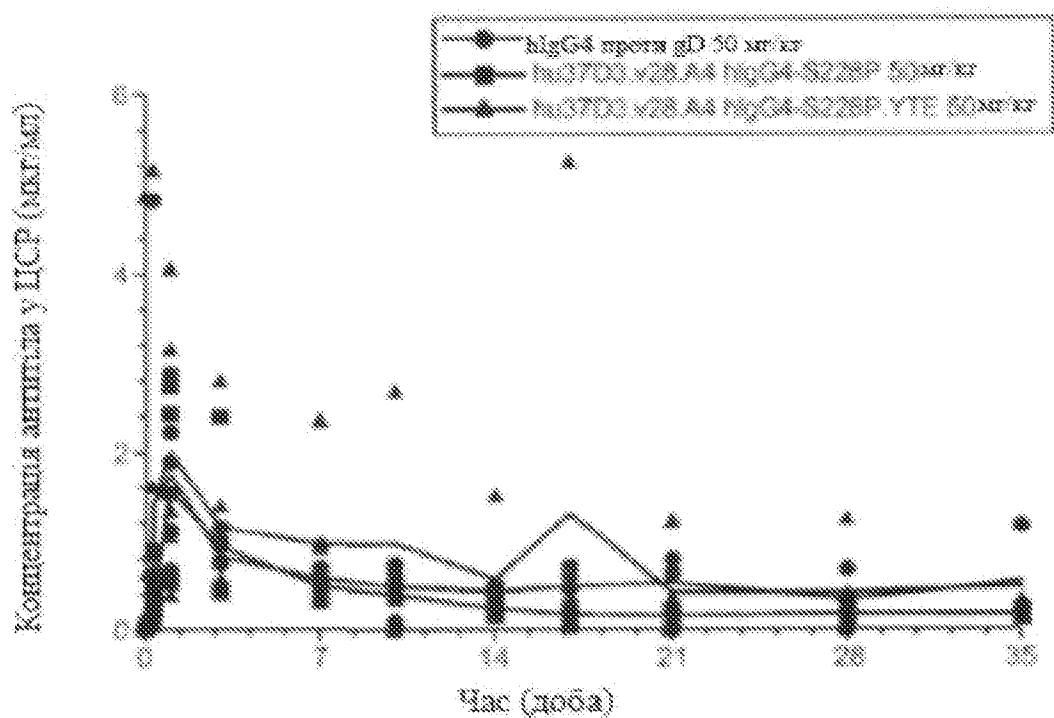


Фиг. 16

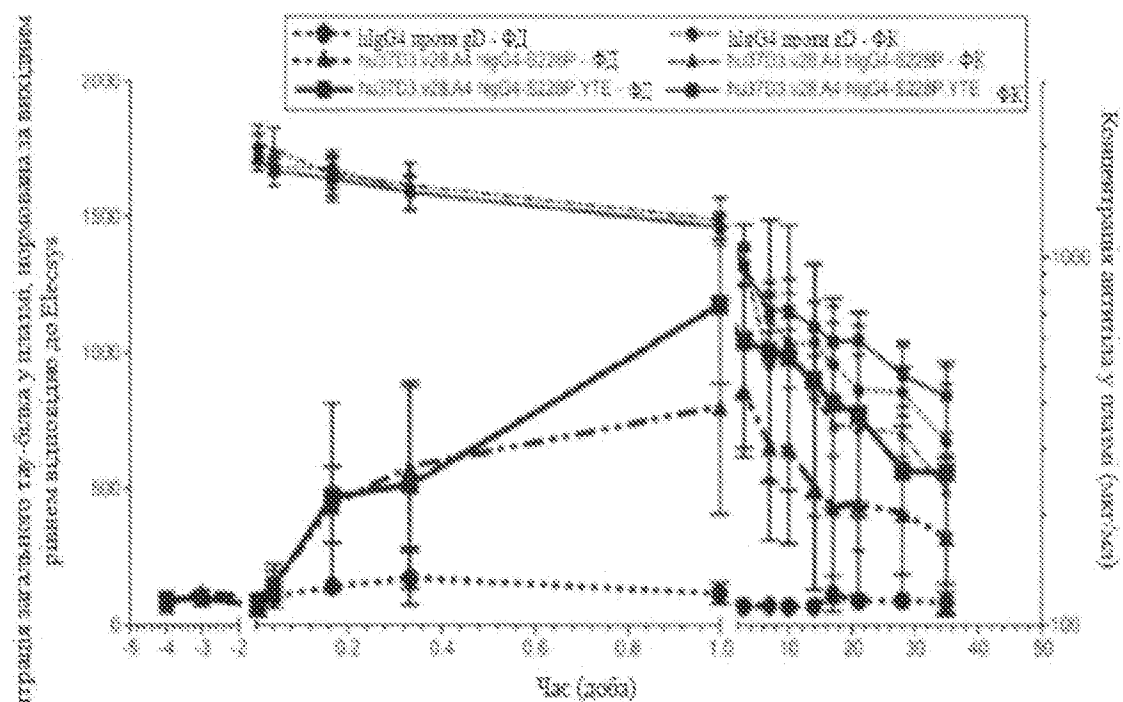


Фиг. 17

Fig. 18



Фиг. 19В



Фиг. 20

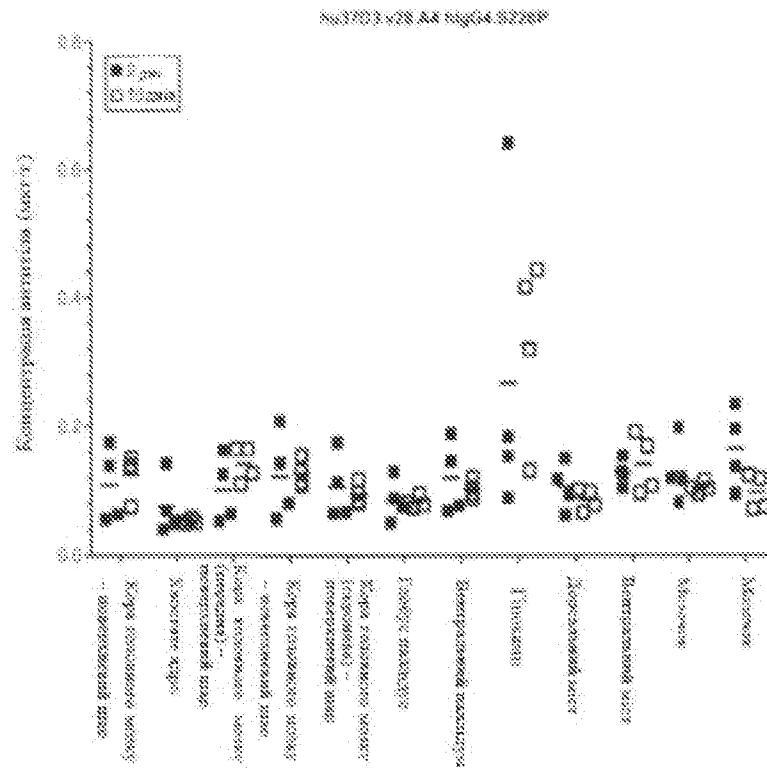


Fig. 21A

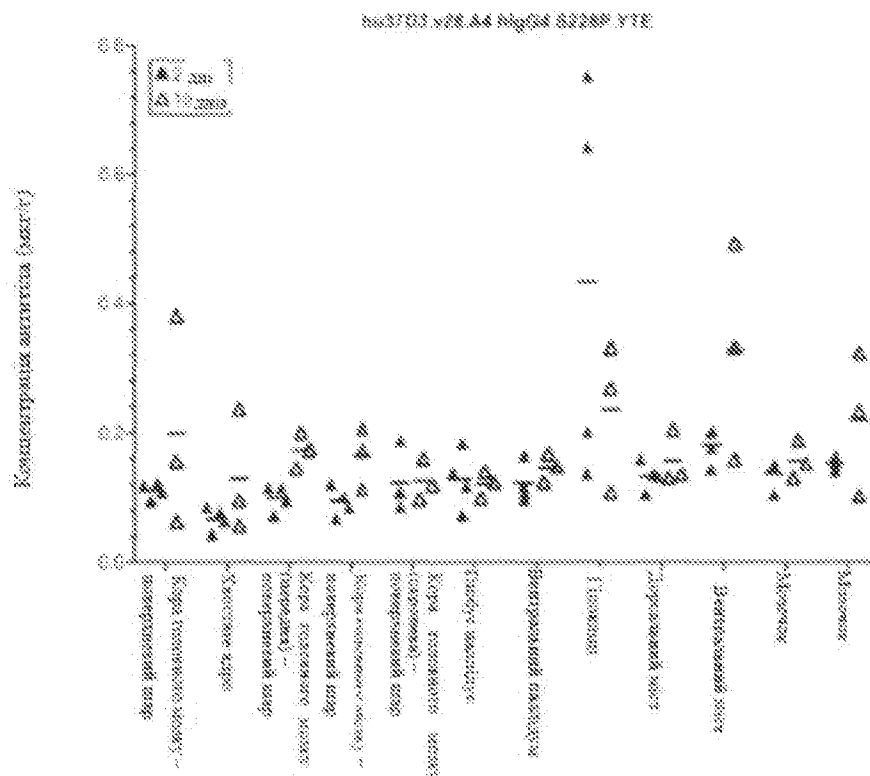


Fig. 21B

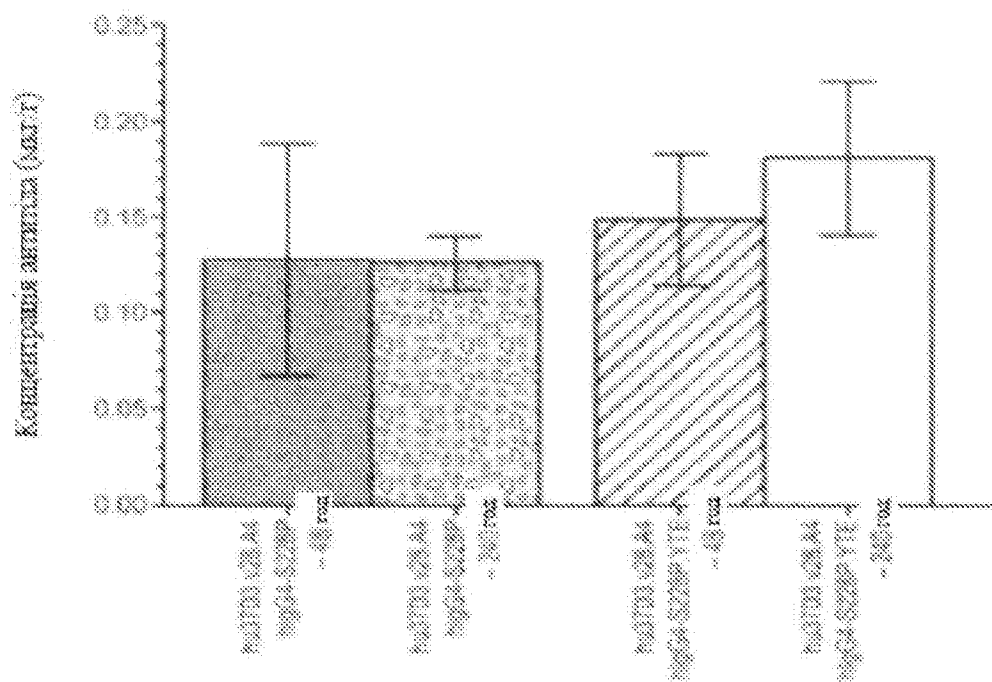


Fig. 21C

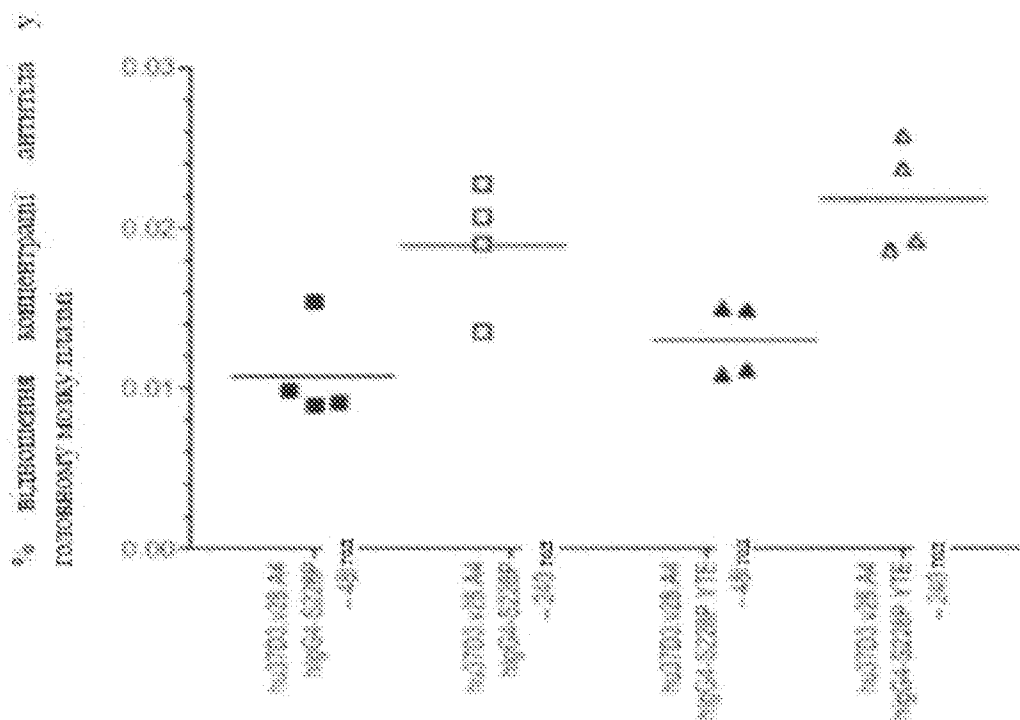


Fig. 21D

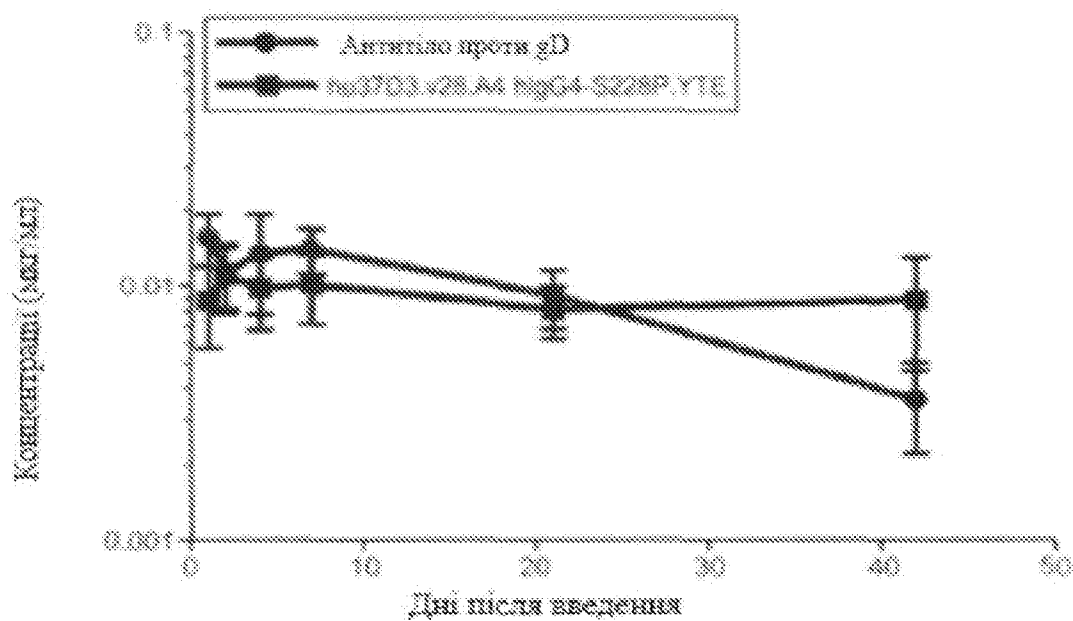


Fig. 22A

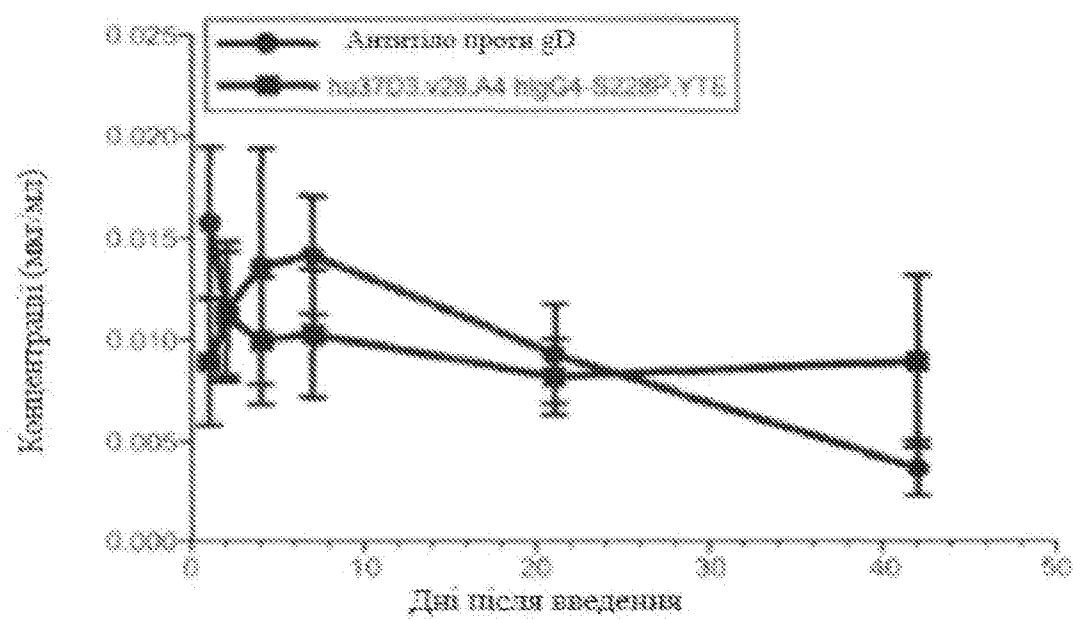


Fig. 22B

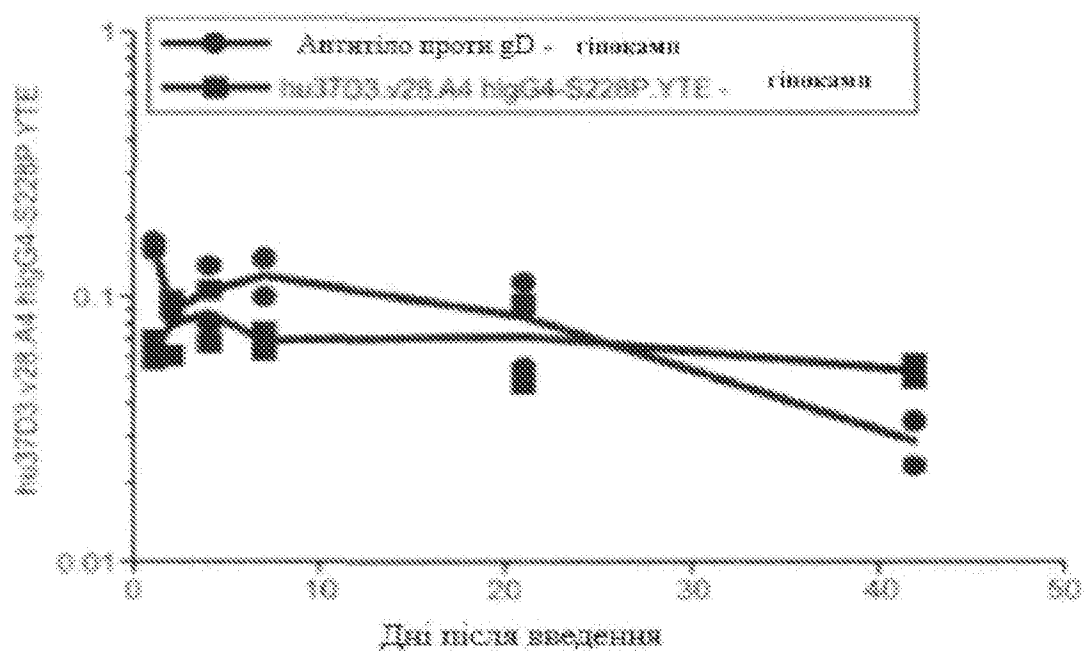


Fig. 23A

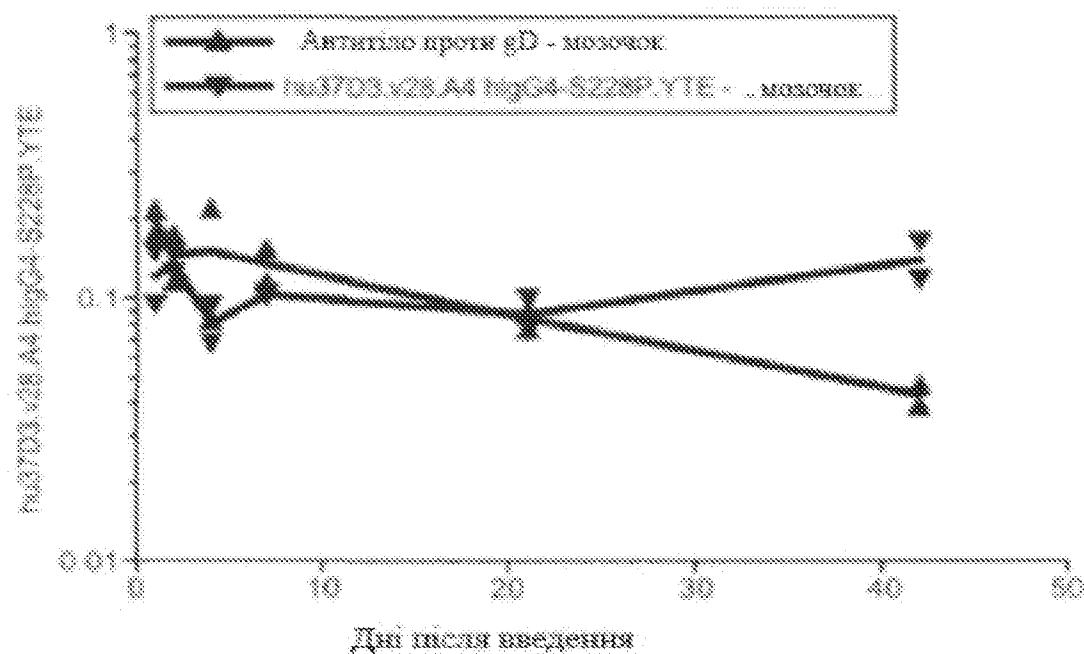


Fig. 23B

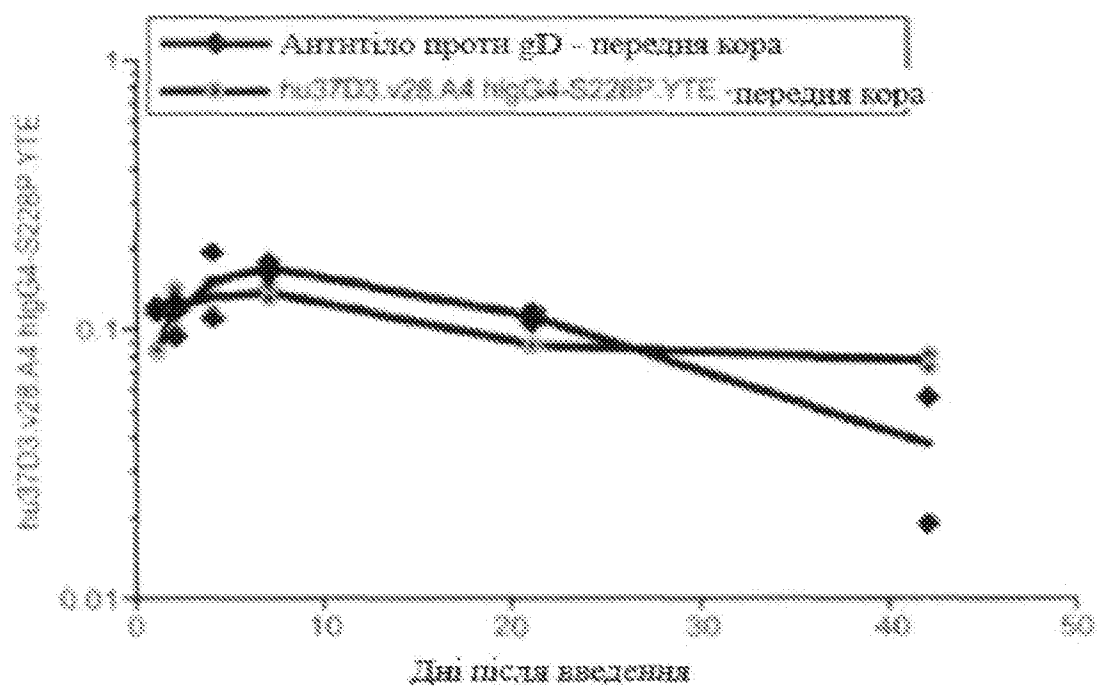


Fig. 23C

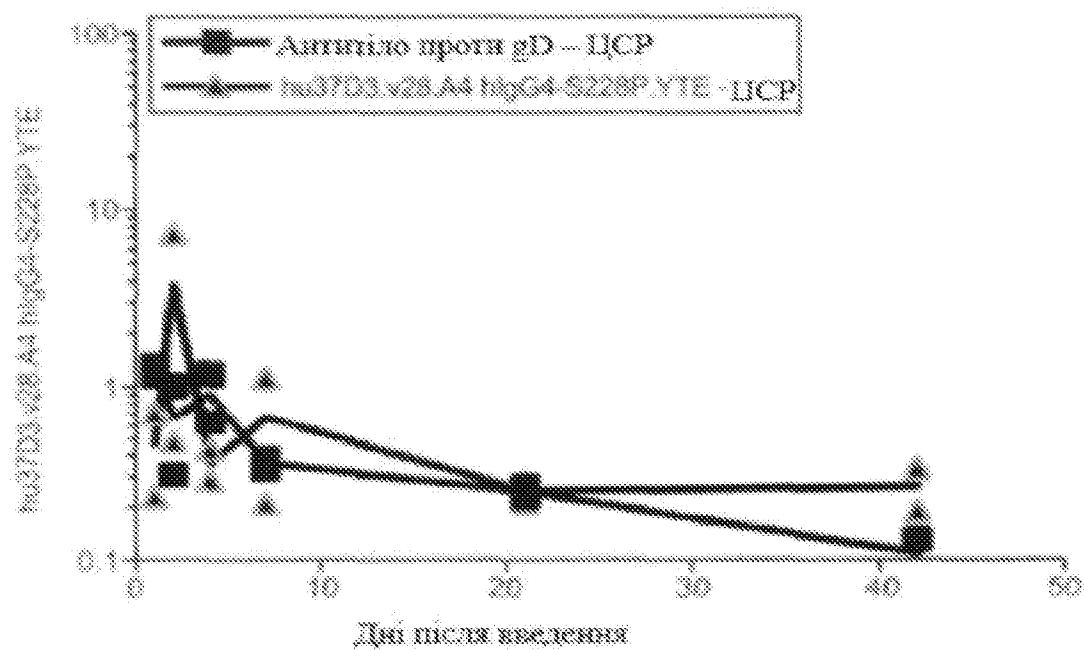


Fig. 23D

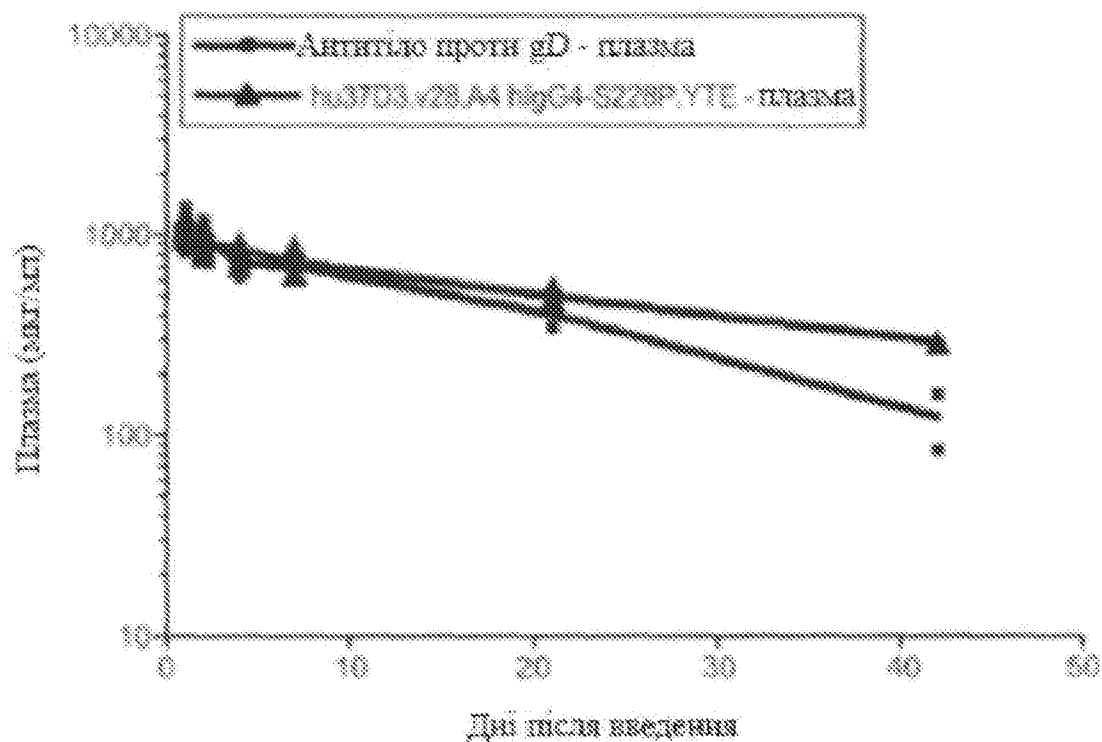


Fig. 23E

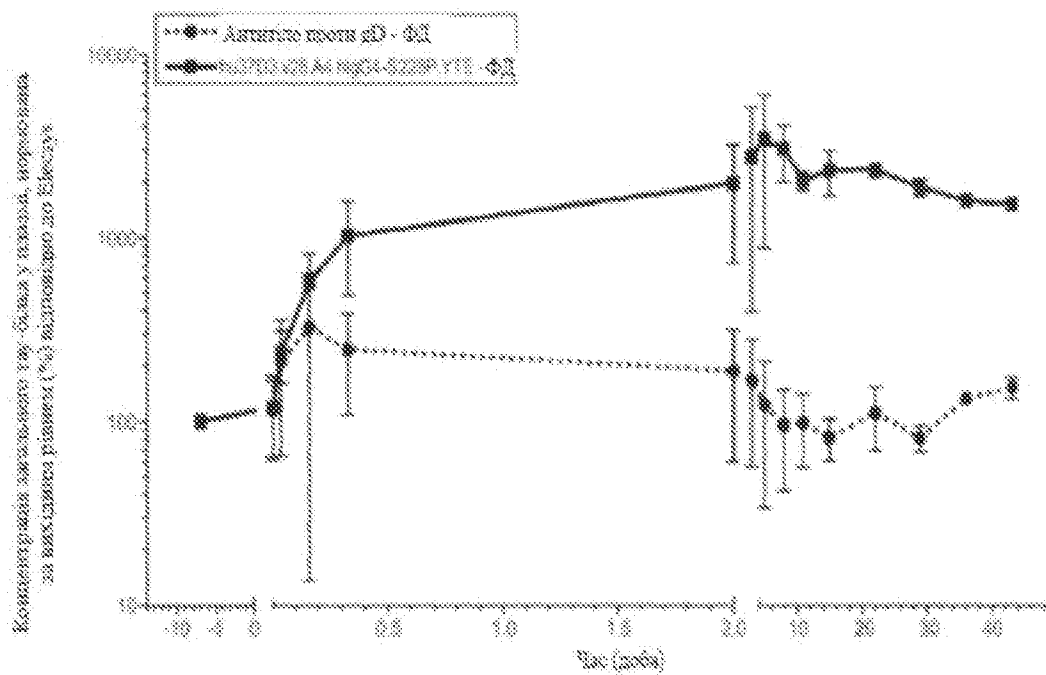


Fig. 24A

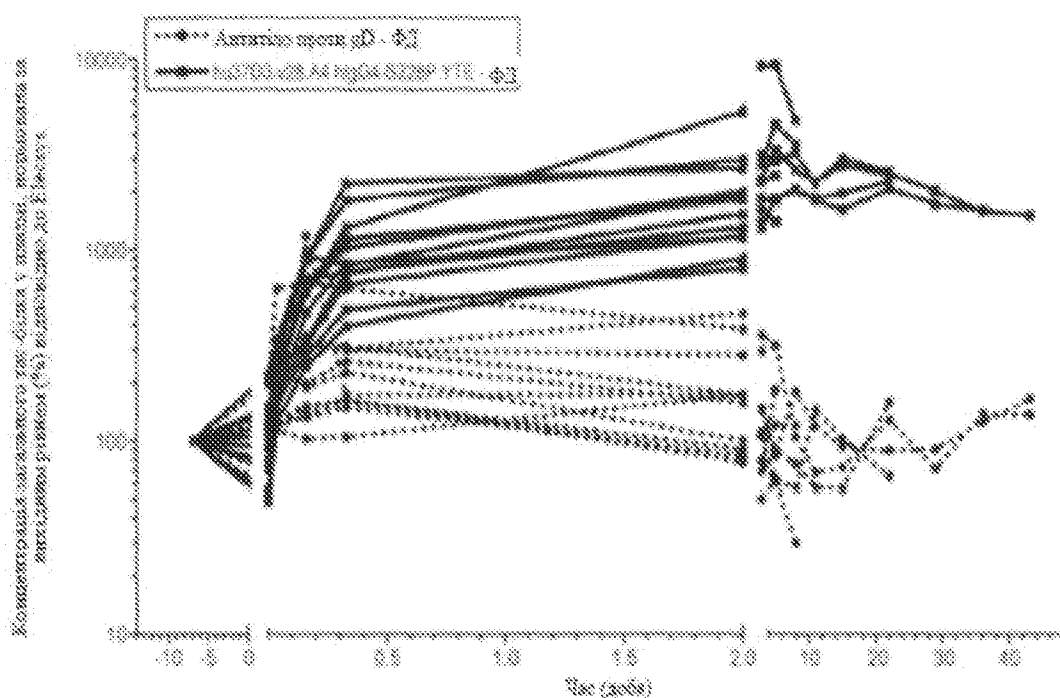


Fig. 24B

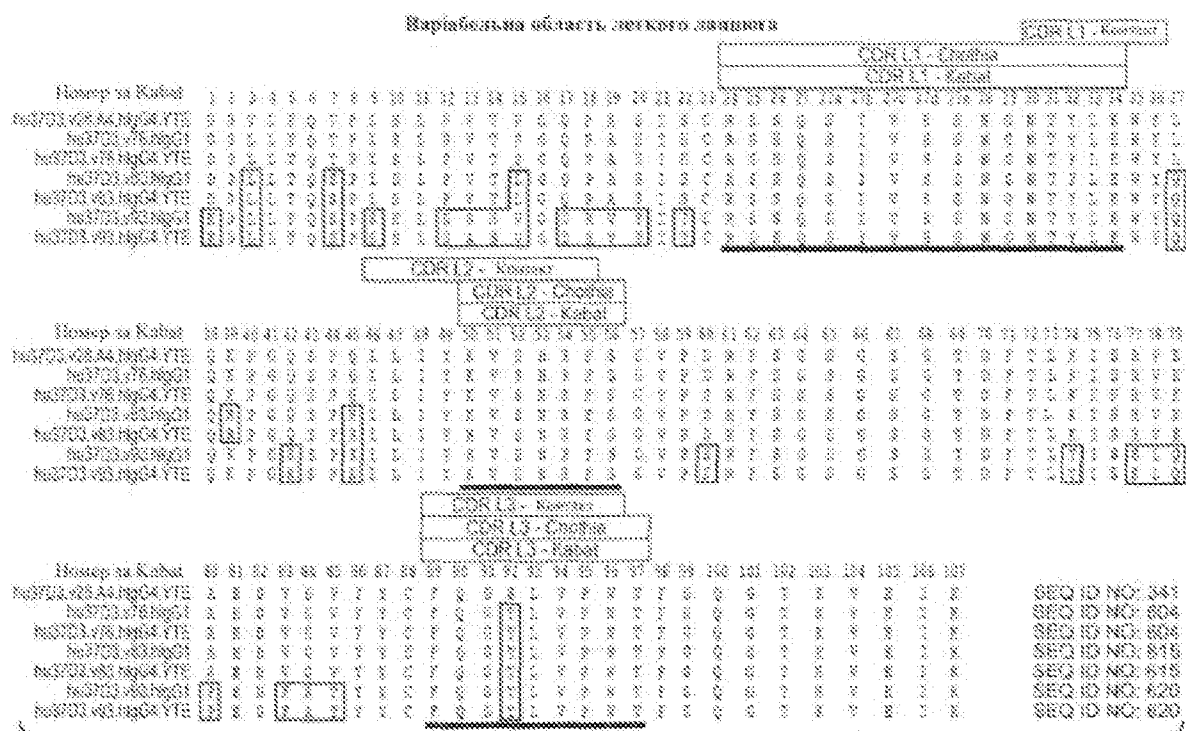


Fig. 25A

Вариабелна област важного ланца

CDR H1 - Sequence

CDR H1 - Chothia

CDR H1 - Kabat

Номер на Кабат	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
h03703.v28.A4.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v78.hg01	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v98.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v03.hg01	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v03.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v93.hg01	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v03.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	

CDR H2 - Sequence

CDR H2 - Chothia

CDR H2 - Kabat

Номер на Кабат	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
h03703.v28.A4.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v78.hg01	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v98.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v03.hg01	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v03.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v93.hg01	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
h03703.v03.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	

CDR H3 - Sequence

CDR H3 - Chothia

CDR H3 - Kabat

Номер на Кабат	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
h03703.v28.A4.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
h03703.v78.hg01	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
h03703.v98.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
h03703.v03.hg01	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
h03703.v03.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
h03703.v93.hg01	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
h03703.v03.hg04.YTE	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q

SEQ ID NO: 340

SEQ ID NO: 803

SEQ ID NO: 803

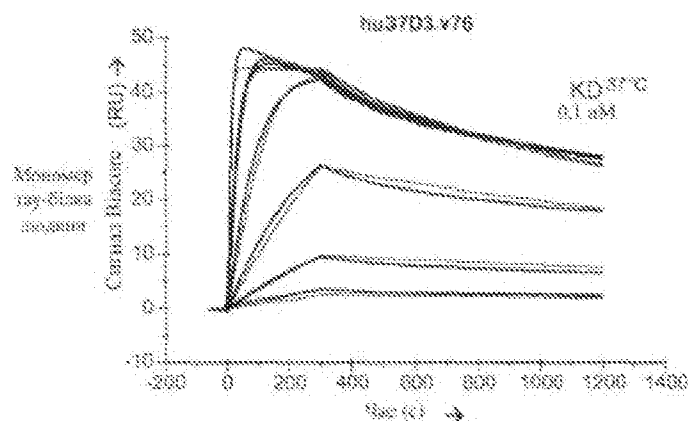
SEQ ID NO: 814

SEQ ID NO: 814

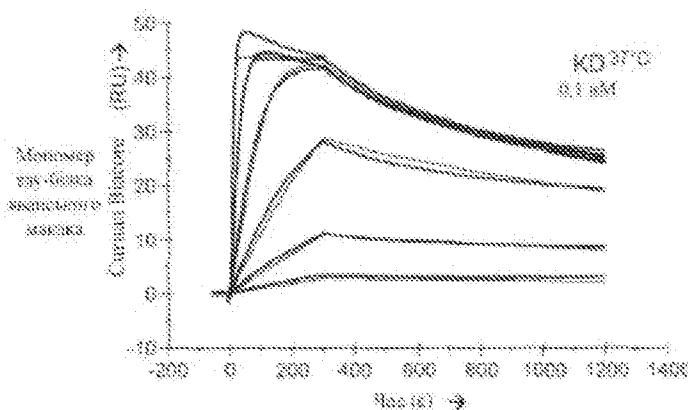
SEQ ID NO: 818

SEQ ID NO: 818

Фиг. 25B



Фиг. 26A



Фиг. 26B

