

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045911**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.01.17

(21) Номер заявки
202192606

(22) Дата подачи заявки
2020.03.25

(51) Int. Cl. *A61P 25/28* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ПИРОГЛУТАМАТ-β-АМИЛОИДУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/823,785

(32) 2019.03.26

(33) US

(43) 2022.01.24

(86) PCT/EP2020/058395

(87) WO 2020/193644 2020.10.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

(72) Изобретатель:
**Ван Брук Бьянка, Меркен Марк (BE),
Эдвардс Уилсон, Сингх Санджайа,
Ло Цзиньцюань, Ла Порте Шерри,
Ганезан Раджжумар, Хуан Чичи (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)**

(56) WO-A1-2018083628

WO-A1-2017123517

WO-A1-2012021469

WO-A2-2017009459

OLIVER WIRTHS ET AL: "Identification of low molecular weight pyroglutamate A{beta} oligomers in Alzheimer disease: a novel tool for therapy and diagnosis", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY: JBC, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 285, no. 53, 31 December 2010 (2010-12-31), pages 41517-41524, XP002658320, ISSN: 1083-351X, DOI: 10.1074/JBC.M110.178707 [retrieved on 2010-10-22] abstract page 41521, right-hand column, paragraph 2 - page 41522, left-hand column

WO-A2-2011151076

JEFFREY L. FROST ET AL: "An anti-pyroglutamate-3 A[beta] vaccine reduces plaques and improves cognition in APP^{swE}/PS1[Delta]E9 mice", NEUROBIOLOGY OF AGING, vol. 36, no. 12, 1 December 2015 (2015-12-01), pages 3187-3199, XP055705467, US ISSN: 0197-4580, DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.021 abstract figures 1-3 page 3197, right-hand column, paragraph 3 - paragraph 4

(57) В изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с 3pE Aβ, и способы получения и применения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, включая применение в составах, введении и наборах. Антитело и его антигенсвязывающие фрагменты и описанные способы можно использовать для диагностики, прогнозирования и лечения болезни Альцгеймера или других связанных с β-амилоидами заболеваний.

B1

045911

045911 B1

Область применения изобретения

Данное изобретение относится к области антител, направленных на бета-амилоидные (A β) пептиды, и к терапевтическим способам с использованием этих антител. В частности, антитела можно использовать для идентификации и лечения связанных с амилоидами расстройств.

Ссылка на перечень последовательностей, поданный в электронном виде

Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде через EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла "JAB7013USPSP Sequence Listing", датой создания 11 марта 2019 г. и размером 76 кб. Перечень последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Предпосылки создания изобретения

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой дегенеративное расстройство мозга, клинически характеризуемое прогрессирующей потерей памяти, когнитивных функций, способности к рассуждению, принятию решений и эмоциональной устойчивости, что постепенно приводит к глубокому умственному нарушению и в конечном итоге смерти. Болезнь Альцгеймера представляет собой частую причину прогрессирующей умственной отсталости (деменции) у пожилых людей. Болезнь Альцгеймера наблюдалась во всем мире и представляет собой основную проблему общественного здравоохранения. В настоящее время только в США от этой болезни страдают более пяти миллионов человек. В настоящее время она неизлечима, и никакое лечение эффективно не предотвращает БА или не вызывает регресс симптомов или его течения.

В мозге пациентов с БА наблюдаются характерные повреждения, называемые амилоидными бляшками, амилоидной ангиопатией (амилоидными отложениями в кровеносных сосудах) и нейрофибриллярными клубками. Как правило, обнаруживают большие количества таких повреждений, в особенности амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков, в нескольких областях мозга важных для памяти и когнитивных функций. Амилоидные бляшки и амилоидная ангиопатия также характерны для мозга индивидуумов с трисомией 21 (синдром Дауна), болезнью диффузных телец Леви и наследственной церебральной геморагией с амилоидозом голландского типа (HCHWA-D).

Основным компонентом амилоидных бляшек является множество бета-амилоидных (A β) пептидов, которые образуются путем расщепления белка-предшественника β -амилоида (APP). Предполагается, что отложение пептидов A β в головном мозге является ранней и необходимой ступенью в каскаде заболеваний, ведущих к БА. Идентификация мутаций в генах белка-предшественника амилоида и пресенилина, приводящих к изменению продукции A β и вызывающих семейную форму БА с ранним началом, дает убедительные доказательства того, что измененный метаболизм амилоида является центральным событием в патогенном процессе, лежащем в основе заболевания.

Бета-амилоидные пептиды, имеющие пироглутамат в третьем остатке (3pE A β), являются основными молекулами, депонированными в головном мозге пациентов с БА. 3pE A β присутствует почти во всех диффузных и зрелых бляшках при БА, метаболически стабилен и может играть роль как в нуклеации бляшек, так и в стабилизации (Cynis et al., Molecular Neurodegeneration, 2016; 11:48). 3pE A β в обнаружимых количествах в СМЖ или плазме не описан, что дает основания полагать, что целевой пептид является специфичным для патологии (DeMattos et al., Neuron, 2012; 76:1-13). Антитела, которые селективно связываются с 3pE A β , могут быть полезны в иммунотерапии.

Изложение сущности изобретения

Согласно варианту осуществления и полному описанию, изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с β -амилоидом, имеющим пироглутамат в третьем остатке (3pE A β), способам получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с 3pE A β , способам анализа с использованием таких антител или их антигенсвязывающих фрагментов и применению антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению в производстве лекарственного препарата для лечения, задержки развития или регресса по меньшей мере одной патологии или симптома болезни Альцгеймера и других связанных с β -амилоидами заболеваний. Антитела по изобретению предпочтительно связывают пептид A β , содержащий 3pE, по сравнению с пептидом A β , который не содержит 3pE.

В частности, в данном документе описано выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- a. SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 1, 7, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 1, 7, 3, 8, 5, и 6, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 1, 2, 3, 8, 5 и 6, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 56, 57, 3, 8, 5, и 6, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 56, 57, 3, 4, 5, и 6, соответственно;

- g. SEQ ID NO: 56, 58, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 56, 7, 3, 8, 5, и 6, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 1, 57, 3, 8, 5, и 6, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 56, 7, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 1, 57, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 1, 58, 3, 4, 5, и 6, соответственно; или
- m. SEQ ID NO: 56, 2, 3, 4, 5, и 6, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает 3pE Aβ, предпочтительно человеческий 3pE Aβ.

В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 20 или 21, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 10, 12, 14, 18, 22, 53 или 55.

В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- a. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22;
- b. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;
- c. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;
- d. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- e. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- f. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- g. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- h. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;
- i. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;
- j. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 53; или
- k. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 55.

В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным. В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело содержит:

- a. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 38;
- b. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 39, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 38;
- c. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 52; или
- d. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 39, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 54.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы фрагментов, состоящей из Fv, F(ab'), F(ab')₂ и scFv. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент избирательно связывается с пептидом 3pE Aβ (например, Aβ3pE-40 и Aβ3pE-42) с небольшой перекрестной реактивностью или без перекрестной реактивности с другими пептидами Aβ или белком-предшественником β-амилоида (APP).

Также представлены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по описанному в данном документе изобретению.

Также предложены векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также предложены клетки-хозяева, содержащие векторы, содержащие выделенные нуклеиновые

кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению. Также предложены гибридомы, которые продуцируют выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

В определенных вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Также предложены способы лечения патологического состояния, связанного с образованием бляшек, содержащих бета-амилоидный белок, у нуждающегося в этом субъекта. Способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению. В определенных вариантах осуществления патологическое состояние представляет собой болезнь Альцгеймера. В определенных вариантах осуществления патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из деменции, связанной с трисомией 21 (синдром Дауна), болезни диффузных телец Леви, миозита с включениями, церебральной амилоидной ангиопатии и наследственной церебральной геморрагии с амилоидозом голландского типа (HCHWA-D).

Также предложены способы уменьшения бляшек, связанных с болезнью Альцгеймера, у нуждающегося в этом субъекта. Способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению.

Также предложены способы предотвращения активности нуклеации 3pE A β у нуждающегося в этом субъекта. Способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению.

Также предложены способы получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, при этом способы включают культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Также представлены способы получения фармацевтической композиции по изобретению. Способы включают объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Вариант осуществления включает наборы и устройства, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные выше.

Дополнительные объекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники после ознакомления с представленным ниже подробным описанием предпочтительных вариантов осуществления.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена сенсограмма (кинетика единичного цикла), полученная путем безмаркерного обнаружения методом поверхностного плазмонного резонанса аффинного взаимодействия BAMB31_2a (mIgG2a) с человеческим пептидом A β (3pE-40). Серые кривые представляют собой данные с вычитанием двух эталонных сигналов, а черные кривые представляют аппроксимированные значения.

На фиг. 2 представлена сенсограмма (кинетика единичного цикла), полученная путем безмаркерного обнаружения методом поверхностного плазмонного резонанса аффинного взаимодействия mE8c mIgG2a с человеческим пептидом A β (3pE-40). Серые кривые представляют собой данные с вычитанием двух эталонных сигналов, а черные кривые представляют аппроксимированные значения.

На фиг. 3A-3I показана реактивность в отношении бляшек по результатам иммуногистохимического анализа в фиксированной формалином и залитой парафином (FFPE) ткани головного мозга трансгенной мыши для BAMB674 и BAMB675 относительно молекулами HFA для сравнения. Показаны результаты для концентрации первичных антител, равной 0,05 мкг/мл. Стрелки указывают на области помеченных бляшек для BAMB674 и BAMB675. (A) BAMB674; (B) BAMB675; (C) Антитело I; (D) Антитело II; (E) B12L; (F) CI-C7; (G) hE8L; (H) R17L; (I) R17.

На фиг. 4A-4B представлены графики, демонстрирующие селективность BAMB31_1, как показано при помощи обнаружения синтетических человеческих пептидов A β методом сэндвич-ИФА. (A) A β 1-40 (B) A β pE11-40.

На фиг. 5A-5F показана реактивность в отношении бляшек с помощью иммуногистохимии в фиксированной формалином и залитой парафином (FFPE) ткани головного мозга трансгенной мыши для (A-B) BAMB246 (химера huIgG1), (C-D) BAMB674 и (E-F) BAMB675. На панели маленьких вставок показаны окрашенные части головного мозга и область увеличенного размера.

На фиг. 6A-6D показана реактивность в отношении бляшек с помощью иммуногистохимического анализа в криоконсервированной ткани головного мозга при БА с (A, C) 4G8 и (B, D) BAMB31_2a (mIgG2a) при двух различных увеличениях.

На фиг. 7 представлен график, демонстрирующий концентрации антител в сыворотке в разные моменты времени после однократной внутрибрюшинной (в/б) дозы в 20 мг/кг трансгенным мышам.

На фиг. 8 представлен график, демонстрирующий микрогеморрагии после длительного лечения изотипическим контролем и антителами ВАМВ31_2а (mIgG2а) у мышей PDAPP путем оценки количества положительных по Перлсу клеток.

На фиг. 9 представлен график, демонстрирующий амилоидную нагрузку после хронического лечения изотипическим контролем и антителами ВАМВ31_2а (mIgG2а) в гиппокампе мышей PDAPP, измеренную методом иммуноанализа, обнаруживающего Аβ1-х. Значения, обозначенные серым цветом, представляют собой точки данных ниже предела обнаружения для анализа.

На фиг. 10 представлена схема двухкомpartmentной модели для фармакокинетического исследования ВАМВ674 и ВАМВ675 на обезьянах.

На фиг. 11 представлен график, демонстрирующий зависимость ФК от наблюдаемых данных для ВАМВ674 и ВАМВ675. Концентрации мкАт к НФА ВАМ31 в сыворотке после внутривенного (в/в) болюсного введения 25 мг/кг яванским макакам в качестве IgG1 дикого типа (ДТ в сыворотке) и изотипа +ΥTE IgG1 (ΥTE в сыворотке). Концентрации антител к Аβ 3pE (3pE-AB) μмкг/мл показаны в логарифмической шкале по оси y в зависимости от времени в днях по оси X. Рассчитанный период полужизни (t1/2) для каждого мкАт показан в тексте вставки.

На фиг. 12 представлен график, демонстрирующий концентрации в головном мозге, наблюдаемые для ВАМВ674 и ВАМВ675. На 7-й день и 42-й день уровни мкАт НФА ВАМВ31 IgG1 дикого типа (ДТ в головном мозге) и изотипа +ΥTE IgG1 (ΥTE в головном мозге) в лизате головного мозга после в/в болюсного введения 25 мг/кг яванским макакам. Концентрации антител к Аβ 3pE (3pE-AB) μмкг/мл показаны в логарифмической шкале по оси y в зависимости от времени в днях по оси X.

Подробное описание изобретения

В разделе "Предпосылки создания изобретения" и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий или т.п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для изобретения. Такое описание не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

Необходимо понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными способами, реагентами, соединениями, композициями или биологическими системами, которые могут варьироваться. Следует также иметь в виду, что применяемые в данном документе термины используются только в целях описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не носят ограничительного характера.

Если не указано иное, все технические и научные термины в настоящем документе имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае, определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в настоящем описании.

Необходимо отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в этом ряду. Специалисты в данной области смогут определять или с помощью лишь стандартных экспериментов смогут устанавливать множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанного в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в изобретение.

В настоящем документе термины "содержит", "содержащий", "включает", "включающий", "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий" или любая другая их вариация подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение из него какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и они являются не исключающими или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит перечень элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не перечисленные прямо или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если в явной форме не указано иное, союз "или" относится к включающему "или", а не к исключающему "или". Например, условие "А или В" выполняется в любой одной из следующих ситуаций: А истинно (или присутствует), а В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), а В истинно (или присутствует), и оба элемента А и В истинны (или присутствуют).

В настоящем документе соединительный термин "и/или" между множеством перечисляемых элементов следует понимать как включающий как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены "и/или", первый вариант относится к возможности применения первого

элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов вместе. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина "и/или" в контексте данного документа. Кроме того, подразумевается, что одновременное применение более одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина "и/или".

В настоящем документе термин "состоять из" или его варианты, такие как "состоит из" или "состоящий из", используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но при этом никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

В настоящем документе термин "состоять по существу из" или варианты, такие как "состоит по существу из" или "состоящий по существу из", используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, а также на необязательное включение любого перечисленного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

Антитела.

В изобретении предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое особенно предпочтительно связывается с пептидом ЗрЕ Аβ по сравнению с пептидом Аβ, который не содержит ЗрЕ. Дополнительно предложены способы получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с пептидом ЗрЕ Аβ, и способы получения гибридом, которые продуцируют антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с пептидом ЗрЕ Аβ. Изобретение также включает способ лечения болезни Альцгеймера и других связанных с β-амилоидами заболеваний у индивидуума, способ устранения бляшек, связанных с болезнью Альцгеймера или другими связанными с β-амилоидами заболеваниями, и способ предотвращения активности нуклеации бляшек ЗрЕ Аβ. В изобретении также предложены наборы и устройства, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, для применения в описанных способах.

Согласно конкретному аспекту, данное изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- a. SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 1, 7, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 1, 7, 3, 8, 5, и 6, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 1, 2, 3, 8, 5 и 6, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 56, 57, 3, 8, 5, и 6, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 56, 57, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 56, 58, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 56, 7, 3, 8, 5, и 6, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 1, 57, 3, 8, 5, и 6, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 56, 7, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 1, 57, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 1, 58, 3, 4, 5, и 6, соответственно; или
- m. SEQ ID NO: 56, 2, 3, 4, 5, и 6, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает ЗрЕ Аβ, предпочтительно человеческого ЗрЕ Аβ.

Согласно еще одному конкретному аспекту изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 20 или 21, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 10, 12, 14, 18, 22, 53 или 55.

Согласно еще одному конкретному аспекту данное изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, содержащему:

- l. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22;
- m. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;
- n. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

мере на 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98, или 99% идентична SEQ ID NO: 12. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 1, 7, 3, 8, 5 и 6, соответственно, или SEQ ID NO: 56, 57, 3, 8, 5 и 6, соответственно, или SEQ ID NO: 56, 7, 3, 8, 5 и 6, соответственно, или SEQ ID NO: 1, 57, 3, 8, 5 и 6, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98, или 99% идентична SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98, или 99% идентична SEQ ID NO: 10. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10.

В еще одном конкретном аспекте выделенное моноклональное антитело содержит:

- a. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 38;
- b. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 39, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 38;
- c. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 52; или
- d. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 39, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 55.

Согласно еще одному конкретному аспекту изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

Согласно другому конкретному аспекту изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

Согласно другому конкретному аспекту изобретение относится к антигенсвязывающим фрагментам, причем антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы фрагментов, состоящей из f Fv, F(ab'), F(ab')₂ и scFv. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент избирательно связывается с пептидом 3pE Aβ (например, Aβ3pE-40 и Aβ3pE-42) с небольшой перекрестной реактивностью или без перекрестной реактивности с другими пептидами Aβ или белком-предшественником β-амилоида (APP).

В другом общем аспекте данное изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению. Специалистам в данной области техники будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, путем замены, делеции, вставки и т.п.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие моноклональные антитела по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте данное изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания, такой как плаزمид, космид, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный экспрессионный вектор, такой как плазмид. Вектор может включать любой элемент для обеспечения стандартной функции экспрессионного вектора, например промотор, элемент для связывания с рибосомой, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцируемым или репрессируемым промотором. Ряд экспрессионных векторов, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известны в данной области и могут быть использованы в настоящем изобретении для получения в клетке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Для генерации рекомбинантного экспрессионного вектора по вариантам осуществления изобретения можно использовать традиционные клональные методы или синтез искусственных генов.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную

нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. В контексте настоящего описания для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов настоящего описания можно применять любую клетку-хозяин, известную специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, scFv или Fab-антитела), клетки CHO-DG44, или CHO-K1, или клетки HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG). В соответствии с конкретными вариантами осуществления рекомбинантный вектор экспрессии трансформируют в клетки-хозяева традиционными способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрируется в геном клетки-хозяина так, что рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессируется.

В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми методиками, известными в данной области техники и как описано в данном документе.

В настоящем изобретении предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с 3pE Aβ. Термин "антитело" в данном документе означает белок иммуноглобулин, способный связываться с антигеном или его частью, в частности белок иммуноглобулин, способный специфически связываться с 3pE Aβ. Связывание антитела с антигеном может быть измерено при помощи способов, известных специалистам в данной области техники, примером которых является применение инструмента BIAcore™. Считается, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела специфически связываются с антигеном, если константа диссоциации меньше или равна 1 мкМ, предпочтительно меньше или равна 100 нМ и наиболее предпочтительно меньше или равна 10 нМ.

Термин "антигенсвязывающие фрагменты антител" относится к фрагменту антитела, который может связываться с антигеном, с которым интактное антитело связывается и конкурирует с интактным антителом за связывание с антигеном. Антигенсвязывающие фрагменты содержат часть интактного антитела, которая обеспечивает связывание антигена (т.е. переменную область интактного антитела). Антигенсвязывающие фрагменты могут включать, но не ограничиваясь этим, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, стабилизированный дисульфидом фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), одноцепочечную молекулу антитела (например, scFv), диатело, минитело, нанотело, линейное антитело, однодоменное антитело (HDAB), верблюжье однодоменное антитело, полиспецифическое антитело, образованное из фрагментов антитела, и любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит структуру полного антитела.

Антитела состоят из двух тяжелых цепей и двух легких цепей. Каждая тяжелая цепь имеет один переменный домен или область (V_H), за которой следует константный домен или область (C_H1), шарнирная область и еще два константных домена или области (C_H2 и C_H3). Каждая легкая цепь имеет один переменный домен или область (V_L) и один константный домен или область (C_L). Переменные домены или области тяжелой и легкой цепей образуют паратоп антитела (структуру, аналогичную замку), который специфичен для конкретного эпитопа (аналогично ключу), что позволяет паратопу и эпитопу с точностью связываться друг с другом. В переменном домене переменные петли β-цепей, по три на легкой и тяжелой цепях, отвечают за связывание с антигеном. Эти петли называют определяющими комплементарность областями (CDR, а именно CDR1, CDR2 и CDR3).

CDR определяют как определяющие комплементарность области антитела. Это гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела, которые главным образом отвечают за связывание с антигеном. В каждой из переменных областей тяжелой и легкой цепей имеются три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3). Определяющие комплементарность области переменных областей легкой цепи альтернативно упоминаются как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а определяющие комплементарность области переменной области тяжелой цепи альтернативно упоминаются как HCDR1, HCDR2 и HCDR3. CDR антитела могут быть определены несколькими способами. Например, CDR в переменной области можно идентифицировать в соответствии с определениями по Kabat, Chothia, IMGT и/или конформационным определениям или любым способом определения CDR, хорошо известным в данной области техники. CDR антитела можно идентифицировать как гипервариабельные области, первоначально определенные Kabat (Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C.), структурные петлевые структуры, первоначально описанные Chothia (Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)) или уникальной системой нумерации IMGT (Lefranc, The Immunologist 7:132-136 (1999); Lefranc, et al., Nucleic Acids Res. 27:209-212 (1999); Scaviner et al., Exp. Clin. Immunogenet. 16:234-240

(1999); Lefranc, et al., *Nucleic Acids Res.* 43:D413-422 (2015)).

Термин "выделенное" при использовании в контексте антитела означает измененное "при помощи воздействия человека" из любого естественного состояния; то есть, если оно встречается в природе, оно было изменено или удалено из своей первоначальной среды, или и то, и другое. Например, природное антитело природного происхождения, естественно присутствующие в живом животном в его естественном состоянии, не является "выделенным", а то же антитело, отделенное от сопутствующих материалов в его естественном состоянии, является "выделенным", согласно термину, используемому в данном документе, например, термин "выделенное антитело" может относиться к антителу, которое по существу не содержит других антител, имеющих разные значения антигенной специфичности (т.е. выделенное антитело, которое специфически связывается с ЗрЕ Аβ, по существу не содержит антител, которые не связываются с ЗрЕ Аβ). Антитела могут встречаться в композиции, такой как реагент для иммуноанализа, которая не является природной композицией, и при этом остаются выделенными антителами в рамках данного термина, используемого в данном документе.

Способы получения антител включают модификацию хозяина желаемым иммуногеном. Подходящие хозяева включают, но не ограничиваясь этим, мышей, крыс, хомяков, морских свинок, кроликов, кур, ослов, лошадей, обезьян, шимпанзе, орангутанов, горилл, людей и любых видов, способных формировать зрелый иммунный ответ. Процедуры иммунизации хорошо известны в данной области техники и изложены во множестве трудов и публикаций, включая "The Immunoassay Handbook", 2nd Edition, edited by David Wild (Nature Publishing Group, 2000).

Предпочтительно иммуноген, воплощающий существенные признаки настоящего изобретения, вводят субъекту-хозяину, например, животному или человеку, в комбинации с адъювантом. Подходящие адъюванты включают, но не ограничиваясь этим, адъювант Фрейнда, порошковый гидроксид алюминия (квасцы), гидроксид алюминия вместе с *Bordetella pertussis* и монофосфориллипид А-синтетический дикориномиколят трегалозы (MPL-TDM).

Как правило, иммуноген или комбинацию иммуногена и адъюванта вводят в организм-хозяин млекопитающего путем одной или множества подкожных или внутривенных инъекций. Предпочтительно программу иммунизации выполняют в течение по меньшей мере одной недели, а более предпочтительно в течение двух или более недель. Поликлональные антитела, полученные таким образом, могут быть выделены и очищены способами, хорошо известными в данной области техники.

Моноклональные антитела могут быть получены с помощью хорошо известных гибридных способов, описанных в публикации Kohler и Milstein, например, *Nature* 256:495-497 (1975). Гибридные способы, как правило, включают иммунизацию хозяина или лимфоцитов от хозяина, сбор лимфоцитов, секретирующих или обладающих потенциалом к секреции моноклональных антител, слияние лимфоцитов с иммортализованными клетками и отбор клеток, секретирующих желаемое моноклональное антитело.

Хозяин может быть иммунизирован для стимуляции лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, специфические к иммуногену. В альтернативном варианте осуществления лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Если необходимы человеческие клетки, можно использовать лимфоциты периферической крови, хотя предпочтительными являются клетки селезенки или лимфоциты из других источников, относящихся к млекопитающим.

Лимфоциты могут быть слиты с иммортализованной линией клеток с образованием клеток гибридомы, что можно упростить путем применения агента для слияния, например, полиэтиленгликоля. В качестве иллюстрации можно использовать мутантные клетки миеломы грызунов, коровы или человека, иммортализованные путем трансформации. Предпочтительными являются по существу чистые популяции клеток гибридомы, в отличие от неслитых иммортализованных клеток. Таким образом, после слияния клетки можно выращивать в подходящей среде, которая ингибирует рост или выживаемость неслитых, иммортализованных клеток, например, с помощью клеток мутантной миеломы, в которых отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT). В таком случае в среду (среду НАТ) можно добавлять гипоксантин, аминоптерин и тимидин для предотвращения роста HGPRT-дефицитных клеток, одновременно допуская рост гибридом.

Предпочтительно иммортализованные клетки, которые обеспечивают эффективное слияние, можно выделять из смешанных популяций путем отбора в среде, такой как НАТ, и поддерживать стабильную и высокоуровневую экспрессию антитела после слияния. Предпочтительные иммортализованные линии клеток включают линии клеток миеломы, доступные в Американской коллекции типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния.

Один аспект данного изобретения представляет собой способ получения линии клеток гибридомы, способной продуцировать моноклональное антитело, которое связывается с пептидами бета-амилоида. Такие способы широко известны специалистам в данной области техники и по существу включают: (i) выбор хозяина для продукции антител; (ii) инокулирование хозяина желаемым иммуногеном; (iii) слияние линии клеток из инокулированного хозяина с непрерывно делящейся клеткой с образованием слитой клетки, способной продуцировать моноклональное антитело, которое связывается с иммуногеном; и (iv)

клонирование слитой клетки для получения линии клеток гибридомы.

Способ по данному изобретению включает получение линии клеток гибридомы, способной продуцировать моноклональное антитело, которое связывается с пептидом ЗрЕ Аβ. Гибридомы можно получать путем иммунизации животного, от которого можно получать гибридомы, например, мыши Balb/c, путем начальных внутрибрюшинных инъекций желаемых иммуногенов, например, пептида Аβ, имеющего пироглутамат, в адьюванте Фрейнда, и последующих бустерных инъекций, например каждые одну - две недели. Последующее слияние выделенной селезенки может быть выполнено с использованием любых методик, общеизвестных обычным специалистам в данной области техники, предпочтительно с использованием клеток SP2/0 с помощью модифицированной процедуры, описанной в публикации Kohler и Milstein (Eur. J. Immunol., 1976; 6:292-295). Гибридомы могут быть подвергнуты скринингу для определения тех, которые продуцируют антитела, специфичные к пептидам ЗрЕ Аβ. Скрининг можно проводить с помощью стандартного анализа, такого как ИФА или РИА. Один аспект изобретения представляет собой способ получения линии клеток гибридомы, которая продуцирует моноклональное антитело ВАМВ31_1 или его гуманизованную версию.

Моноклональные антитела также могут быть получены рекомбинантными способами, известными в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4166452. ДНК, кодирующая моноклональные антитела, может быть выделена и секвенирована с использованием стандартных процедур, например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые специфически связываются с генами тяжелой и легкой цепей антител мыши, предпочтительно для зондирования ДНК, выделенной из линий клеток гибридомы моноклональных антител, секретирующих антитела, специфические к Аβ, имеющим пироглутамат.

Также могут быть получены фрагменты антител, содержащие специфические сайты связывания для пептидов бета-амилоида. Такие фрагменты включают, но не ограничиваясь этим, фрагменты F(ab')₂, которые могут быть получены путем расщепления пепсином молекулы антитела, и фрагменты Fab, которые могут быть получены путем уменьшения дисульфидных мостиков фрагментов F(ab')₂. Альтернативно могут быть сконструированы библиотеки экспрессии Fab, позволяющие быстро и легко идентифицировать моноклональные фрагменты Fab с желаемой специфичностью (Huse et al., Science 256:1270-1281 (1989)). Фрагменты антител Fab, Fv и ScFv можно экспрессировать и секретируют из *Escherichia coli*, что позволяет продуцировать большие количества этих фрагментов. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH можно непосредственно выделять из *E. coli* и химически связывать с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., BioTechnology 10:163-167 (1992)). Другие способы получения фрагментов антител известны специалистам в данной области техники. Также предусмотрены одноцепочечные фрагменты Fv (scFv) (см., например, патенты США № 5761894 и 5587458). Фрагменты Fv и sFv являются единственным соединением с интактными связывающими сайтами, которые не содержат константных областей; таким образом, они, вероятно, будут демонстрировать сниженное неспецифическое связывание. Фрагмент антитела также может представлять собой "линейное антитело", например, как описано в патенте США № 5642870.

Таким образом, целью изобретения является обеспечение выделенных моноклональных антител, экспрессируемых вышеупомянутыми клетками гибридомы, причем антитела способны специфически распознавать ЗрЕ Аβ. Выделенные моноклональные антитела могут быть экспрессированы клетками гибридомы или рекомбинантно.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению предпочтительно селективно связывается с ЗрЕ Аβ с низкой перекрестной реактивностью или без нее в отношении другого Аβ, не имеющего ЗрЕ, или белка-предшественника β-амилоида (APP). В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению селективно связывается с пептидами Аβ ЗрЕ-40 (SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 45) и Аβ ЗрЕ-42 (SEQ ID NO: 51) с низкой перекрестной реактивностью или без нее в отношении других не содержащих ЗрЕ пептидов Аβ или APP.

В табл. 1 представлены аминокислотные последовательности антитела по изобретению. CDR переменных областей тяжелой и легкой цепей, как определено по Kabat, Chothia и IMGT, представлены в виде отдельных последовательностей.

Таблица 1
Последовательности моноклональных антител к 3pE Aβ

мкАт	Область	SEQ ID NO:	Последовательность
BAMB31_1	Тяжелая цепь		
	VH	9	EIQLQQSGPELVKPGTSVKVSCKASGHVFTSYD MYWVKQSHGKSLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAY YRYAMDYWGQGTSVTVSS
	HCDR1 Kabat	1	SYDMY
	HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY
	HCDR2 Kabat	7	YIDSDNGDTSYNQKFKG
	HCDR2 AbM	57	DSDNGDTS
	HCDR3	3	YRYAMDY
	Легкая цепь		
	VL	10	DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSNGKT YLTWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSG AGTDFTLKIIRVEAEDLGVYYCWQGFHPYTFGGG TKLEIK
	LCDR1	8	KSSQSLLDSNGKTYLT
	LCDR2	5	LVSKLDS
	LCDR3	6	WQGFHPYT
BAMB31_2a	Тяжелая цепь	23	EIQLQQSGPELVKPGTSVKVSCKASGHVFTSYDMY WVKQSHGKSLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAYRYAM DYWGQGTSVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSS VTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVL QSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKV DKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIK DVLMIKSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVE VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHGDWMSGK

			EFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP PEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKT ELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLNHHHTTKSFSRTPGK
VH	9		EIQLQQSGPELVKPGTSVKVSCASGHVFTSYDMY WVKQSHGKSLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAYRYAM DYWGQGTSVTVSS
HCDR1 Kabat	1		SYDMY
HCDR1 AbM	56		GHVFTSYDMY
HCDR2 Kabat	7		YIDSDNGDTSYNQKFKG
HCDR2 AbM	57		DSDNGDTS
HCDR3	3		YRYAMDY
Легкая цепь	24		DVVMQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSNGKT YLTWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSG AGTDFTLKIIRVEAEDLGVYYCWQGFHPYTFGGG TKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDS YSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS FNRNEC
VL	10		DVVMQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSNGKT YLTWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSG AGTDFTLKIIRVEAEDLGVYYCWQGFHPYTFGGG TKLEIK
LCDR1	8		KSSQSLLDSNGKTYLT
LCDR2	5		LVSKLDS
LCDR3	6		WQGFHPYT
BAMB246	Тяжелая	25	EIQLQQSGPELVKPGTSVKVSCASGHVFTSYDMY

цепь		WVKQSHGKSLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAYRYAM DYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VH	9	EIQLQQSGPELVKPGTSVKVSCASGHVFTSYDMY WVKQSHGKSLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAYRYAM DYWGQGTSTVTVSS
HCDR1 Kabat	1	SYDMY
HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY
HCDR2 Kabat	7	YIDSDNGDTSYNQKFKG
HCDR2 AbM	57	YIDSDNGDTS
HCDR3	3	YRYAMDY
Легкая цепь	26	DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSNGKT YLTWLLQRPGQSPKRLIYLVSCLDSGVPDRFTGSG AGTDFTLKIRVEAEDLGYYCQWQGFHPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSLSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
VL	10	DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSNGKT

045911

			YLTWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSG AGTDFTLKIIRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK
	LCDR1	8	KSSQSLDSNGKTYLT
	LCDR2	5	LVSKLDS
	LCDR3	6	WQGTHFPYT
BAMB611	Тяжелая цепь	27	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWMGYIDSDNGDTSYNQKFKGR VTMTVDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAYRY AMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKCKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH	11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWMGYIDSDNGDTSYNQKFKGR VTMTVDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAYRY AMDYWGQGLVTVSS
	HCDR1 Kabat	1	SYDMY
	HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY
	HCDR2 Kabat	7	YIDSDNGDTSYNQKFKG
	HCDR2 AbM	57	YIDSDNGDTS
	HCDR3	3	YRYAMDY

	Легкая цепь	28	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSNGKT YLTWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
	VL	12	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSNGKT YLTWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIK
	LCDR1	8	KSSQSLLDSNGKTYLT
	LCDR2	5	LVSKLDS
	LCDR3	6	WQGTHFPYT
BAMB612	Тяжелая цепь	29	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHVFTSYDM YWVRQSPGQGLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGRV TLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCAYRYAM DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH	13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHVFTSYDM YWVRQSPGQGLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGRV TLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCAYRYAM DYWGQGTLLTVSS
	HCDR1 Kabat	1	SYDMY

	HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY
	HCDR2 Kabat	7	YIDSDNGDTSYNQKFKG
	HCDR2 AbM	57	YIDSDNGDTS
	HCDR3	3	YRYAMDY
	Легкая цепь	30	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
	VL	14	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIK
	LCDR1	4	KSSQSLLDS <u>RA</u> KTYLT
	LCDR2	5	LVSKLDS
	LCDR3	6	WQGTHFPYT
BAMB613	Тяжелая цепь	31	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGKV TLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAYRYAM DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

			PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH	15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGKV TLTVDTSSTVYMESSLRSEDTAVYYCAYRYAM DYWGQGTLLTVSS
	HCDR1 Kabat	1	SYDMY
	HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY
	HCDR2 Kabat	7	YIDSDNGDTSYNQKFKG
	HCDR2 AbM	57	YIDSDNGDTS
	HCDR3	3	YRYAMDY
	Легкая цепь	30	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
	VL	14	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIK
	LCDR1	4	KSSQSLD <u>RA</u> KTYLT
	LCDR2	5	LVSKLDS
	LCDR3	6	WQGTHFPYT
BAMB614	Тяжелая цепь	32	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGRV TLTVDTSSTVYMESSLRSEDTAVYYCAYRYAM

		DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VH	16	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGRV TLTVDSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAYRYAM DYWGQGTLVTVSS
HCDR1 Kabat	1	SYDMY
HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY
HCDR2 Kabat	7	YIDSDNGDTSYNQKFKG
HCDR2 AbM	57	YIDSDNGDTS
HCDR3	3	YRYAMDY
Легкая цепь	30	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
VL	14	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT

			KLEIK
	LCDR1	4	KSSQSLD <u>S</u> RAKTYLT
	LCDR2	5	LVSKLDS
	LCDR3	6	WQGFHPYT
BAMB630	Тяжелая цепь	33	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGHVFTSYDM YWVKQAPGQSLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGKV TLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAYRYAM DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTITCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
	VH	17	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGHVFTSYDM YWVKQAPGQSLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGKV TLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAYRYAM DYWGQGTLLTVSS
	HCDR1 Kabat	1	SYDMY
	HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY
	HCDR2 Kabat	7	YIDSDNGDTSYNQKFKG
	HCDR2 AbM	57	YIDSDNGDTS
	HCDR3	3	YRYAMDY
	Легкая цепь	34	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLD <u>S</u> RAKT YLTWLLQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS

			GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
	VL	18	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSRAKT YLTWLLQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIK
	LCDR1	4	KSSQSLLDS <u>RA</u> KTYLT
	LCDR2	5	LVSKLDS
	LCDR3	6	WQGTHFPYT
BAMB631	Тяжелая цепь	35	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQSLEWMGYIDSDNGDTSYNQKFKGR VTLTVDTSTSTVYMESSLRSEDТАVYYCAYRYA MDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH	19	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQSLEWMGYIDSDNGDTSYNQKFKGR VTLTVDTSTSTVYMESSLRSEDТАVYYCAYRYA MDYWGQGLTVTVSS
	HCDR1 Kabat	1	SYDMY
	HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY

	HCDR2 Kabat	7	YIDSDNGDTSYNQKFKG
	HCDR2 AbM	57	YIDSDNGDTS
	HCDR3	3	YRYAMDY
	Легкая цепь	34	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSRAKT YLTWLLQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
	VL	18	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSRAKT YLTWLLQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIK
	LCDR1	4	KSSQSLLDS <u>RA</u> KTYLT
	LCDR2	5	LVSKLDS
	LCDR3	6	WQGTHFPYT
BAMB623	Тяжелая цепь	36	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQSLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGKA TMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAYRYA MDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

	VH	20	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQSLEWIGYIDSDNGDTSYNQKFKGKA TMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAYRYA MDYWGQGLTVTVSS
	HCDR1 Kabat	1	SYDMY
	HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY
	HCDR2 Kabat	7	YIDSDNGDTSYNQKFKG
	HCDR2 AbM	57	YIDSDNGDTS
	HCDR3	3	YRYAMDY
	Легкая цепь	30	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
	VL	14	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIK
	LCDR1	4	KSSQSLDSRAKTYLT
	LCDR2	5	LVSKLDS
	LCDR3	6	WQGTHFPYT
BAMB674	Тяжелая цепь	37	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDSGDTSYNQKFKGRV TLTVDSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAYRYAM DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

		QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VH	21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDSGDTSYNQKFKGRV TLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAYRYAM DYWGQGTLVTVSS
HCDR1 Kabat	1	SYDMY
HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY
HCDR2 Kabat	2	YIDSDSGDTSYNQKFKG
HCDR2 AbM	58	YIDSDSGDTS
HCDR3	3	YRYAMDY
Легкая цепь	38	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
VL	22	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIK
LCDR1	4	KSSQSLLDSRAKTYLT

	LCDR2	5	LVSKLDS	
	LCDR3	6	WQGTHFPYT	
BAMB675	Тяжелая цепь	39	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDSGDTSYNQKFKGRV TLTVDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAYRYAM DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPK PKDTL <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK	
	VH	21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDSGDTSYNQKFKGRV TLTVDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAYRYAM DYWGQGTLLTVSS	
	HCDR1 Kabat	1	SYDMY	
	HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY	
	HCDR2 Kabat	2	YIDSD <u>S</u> GDTSYNQKFKG	
	HCDR2 AbM	58	YIDSD <u>S</u> GDTS	
	HCDR3	3	YRYAMDY	
	Легкая цепь	38	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDRAKT YLTWVLRQRPQGSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF	

			YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
	VL	22	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGT KLEIK
	LCDR1	4	KSSQSLD <u>S</u> RAKTYLT
	LCDR2	5	LVSKLDS
	LCDR3	6	WQGTTHFPYT
BAMB700	Тяжелая цепь	37	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDSGDTSYNQKFKGRV TLTVDSTSTVYMELSSLRSED ^A AVYYCAYRYAM DYWGQGT ^L LVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH	21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDSGDTSYNQKFKGRV TLTVDSTSTVYMELSSLRSED ^A AVYYCAYRYAM DYWGQGT ^L LVSS
	HCDR1 Kabat	1	SYDMY
	HCDR1 AbM	56	GHVFTSYDMY
	HCDR2 Kabat	2	YIDSD <u>S</u> GDTSYNQKFKG

	HCDR2 AbM	58	YIDSD <u>S</u> GDTS
	HCDR3	3	YRYAMDY
	Легкая цепь	52	DVVMTQSP S LPVTLGQPASISCKSSQSL L DSRAKT YLTWLQQRPGQSPRR L IYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK D STY SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT K SF NRGEC
	VL	53	DVVMTQSP S LPVTLGQPASISCKSSQSL L DSRAKT YLTWLQQRPGQSPRR L IYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGT KLEIK
	LCDR1	4	KSSQSL L DS <u>R</u> AKTYLT
	LCDR2	5	LVSKLDS
	LCDR3	6	WQGTHFPYT
BAMB701	Тяжелая цепь	39	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDSGDTSYNQKFKGRV TLTVDTSTSTVYME L SSLRSEDTAVYYCAYRYAM DYWGQGT L TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS G VHTFPAVL QSSGLYSLSSVTV P SSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTL <u>Y</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>R</u> EPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH	21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHVFTSYDM YWVRQAPGQGLEWIGYIDSDSGDTSYNQKFKGRV TLTVDTSTSTVYME L SSLRSEDTAVYYCAYRYAM

			DYWGQGLVTVSS
HCDR1 Kabat	1		SYDMY
HCDR1 AbM	56		GHVFTSYDMY
HCDR2 Kabat	2		YIDSDSGDTSYNQKFKG
HCDR2 AbM	58		YIDSDSGDTS
HCDR3	3		YRYAMDY
Легкая цепь	54		DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
VL	55		DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDRAKT YLTWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGT KVEIK
LCDR1	4		KSSQSLLD <u>SR</u> AKTYLT
LCDR2	5		LVSKLDS
LCDR3	6		WQGTTHFPYT

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, антител к 3pE Aβ и полинуклеотидов, которые их кодируют, полипептидов 3pE Aβ и полинуклеотидов 3pE Aβ, которые их кодируют), относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании для определения максимального соответствия, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального осмотра.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают испытываемую последовательность. При использовании алгоритма сравнения последовательностей в компьютер вводятся испытываемую и эталонную последовательности, при необходимости определяют координаты подпоследовательности и определяют параметры программы алгоритма последовательности. Впоследствии алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательности для испытываемой(-ых) последовательности(-ей) по отношению к эталонной последовательности на основе заданных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), с использованием алгоритма выравнивания областей гомологии по Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), с помощью способа поиска подобия по Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или путем визуального контроля (см. в основном Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, совместное предприятие компаний Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (Дополнение, 1995) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, приемлемых для определения процентной идентичности последовательности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в работе Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 соответственно. Программное обеспечение для проведения BLAST-анализов общедоступно

через Национальный центр биотехнологической информации. Данный алгоритм включает, во-первых, идентификацию пар высококачественных последовательностей (HSP) путем идентификации коротких слов длиной W в искомой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при совмещении со словом той же длины в последовательности базы данных. " T " называют пороговым показателем сходства соседних слов (Altschul с соавт. выше). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как образец для инициации поиска, чтобы найти более длинные HSP с ними. Совпадения слов затем расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока совокупный показатель выравнивания можно увеличивать.

Совокупные баллы вычисляются с использованием параметров M для нуклеотидных последовательностей (балл вознаграждения для пары совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за не совпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей матрицу подсчета баллов используют для расчета совокупного балла. Расширение зачетов слов в каждом направлении прекращает, когда: совокупный балл выравнивания падает на величину X от его максимального достигнутого значения; совокупный балл стремится к нулю или ниже вследствие накопления одного или более отрицательных баллов выравнивания остатков; или в конце каждой последовательности. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используют длину слова (W), равную 11, ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$, а также сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP по умолчанию используют длину слова (W), равную 3, ожидание (E), равное 10, и матрицу замен BLOSUM62 (см., Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

В дополнение к проценту идентичности последовательности, алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства двух последовательностей (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993)). Одно измерение сходства, проводимое алгоритмом BLAST, заключается в определении наименьшей суммарной вероятности ($P(N)$), которая указывает на вероятность, при которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей будет происходить случайным образом. Например, нуклеиновая кислота считается аналогичной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении исследуемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее около 0,1, более предпочтительно менее около 0,01, а наиболее предпочтительно менее около 0,001.

Дополнительным показателем по существу идентичности двух нуклеотидных последовательностей или двух полипептидов является иммунологическое перекрестное реагирование полипептида, кодируемого первой нуклеиновой кислотой, с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, по существу идентичен второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком по существу идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот является гибридизация этих двух молекул друг с другом в строгих условиях.

Способы *in vitro*.

Следует понимать, что предполагается применение всех способов иммунологических анализов с использованием антител или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с предпочтительными на данный момент вариантами осуществления, включая анализы, в которых антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связаны с твердыми фазами, и анализы, в которых антитела находятся в жидкой среде. Способы иммунологических анализов, которые можно использовать для обнаружения аналитов с использованием антител, воплощающих существенные признаки настоящего изобретения, включают, без ограничений, конкурентные (ограниченные реагентами) анализы, в которых меченый аналит (аналог аналита) и аналит в образце конкурируют за антитела, и иммунометрические анализы с одним сайтом, в которых антитело является меченым; и т.п.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению можно использовать в обычных иммунологических методах для обнаружения $A\beta_{3pE}$, где бы он ни возник, включая биологические образцы для мониторинга связанных с β -амилоидом заболеваний, и кондиционированные среды из культуры клеток для мониторинга внутриклеточного процессинга APP. Подходящие иммунологические методы хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, например, ИФА, вестерн-блоттинг, конкурентный или сэндвич-иммуноанализ и т.п., а также хорошо известны, все они зависят от образования иммунного комплекса антиген-антитело, причем с целью анализа антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть помечены с возможностью обнаружения, например, радио-, ферментативными, люминесцентными или флуоресцентными метками, или они могут быть иммобилизованы на нерастворимых носителях. Таким образом, целью настоящего изобретения является обеспечение иммуноанализов для определения или обнаружения $A\beta_{3pE}$ или его фрагмента в образце, при этом способ включает приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с $A\beta_{3pE}$ или его фрагментом согласно изобретению и определение

того, образован ли иммунный комплекс между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и Аβ3pE или его фрагментом. Эти способы могут быть выполнены либо на образцах ткани, либо на образцах жидкостей организма и по существу включают получение образца из организма субъекта; приведение указанного образца в контакт с эффективным для визуализации количеством меченого с возможностью обнаружения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению; и обнаружение метки для установления в образце присутствия Аβ3pE или его фрагментов. Способы измерения с использованием антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению не имеют конкретных ограничений. Можно использовать любой способ измерения при условии, что количество антител, антигенов или комплексов антиген-антитело соответствует количеству антигенов, в частности, количество Аβ3pE или его фрагментов в оцениваемых растворах определяют химическими или физическими средствами и рассчитывают на основании стандартных кривых, полученных с использованием стандартных растворов, содержащих антигены в известных количествах. Например, целесообразно использовать нефелометрию, конкурентные методы, иммунометрические методы и сэндвич-методы. Что касается чувствительности и специфичности, особенно предпочтительно использовать сэндвич-методы.

В сэндвич-методах исследуемые растворы взаимодействуют с нерастворимыми антителами, такими как нерастворимые антитела к Аβ3pE (первая реакция), далее реагируют с мечеными вторичными антителами (вторая реакция); затем анализируют активность метящих агентов на нерастворимых носителях, посредством чего можно определить количество Аβ3pE или его фрагментов в исследуемых растворах. Первую реакцию и вторую реакцию можно проводить одновременно или последовательно.

В способах измерения в качестве метящих агентов используют метящие вещества, радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные вещества, светящиеся вещества и т.д. Примеры радиоизотопов включают ^{125}I , ^{131}I , ^3H и ^{14}C . Ферменты, как правило, обнаруживают путем конъюгации соответствующего субстрата, который, в свою очередь, катализирует обнаруживаемую реакцию. Их примеры включают, например, бета-галактозидазу, бета-глюкозидазу, щелочную фосфатазу, пероксидазу и малатдегидрогеназу, предпочтительно пероксидазу хрена. К светящимся веществам относятся, например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза. Кроме того, системы авидин-биотин также можно использовать для мечения антител и иммуногенов по настоящему изобретению. Когда иммуногены или антитела нерастворимы, можно использовать либо физическую адсорбцию, либо химическое связывание, как правило, для инактивации или фиксации белков или ферментов. Примеры носителей включают нерастворимые полисахариды, такие как агароза, декстран и целлюлоза, синтетические смолы, такие как полистирол, полиакриламид и силиконовые полимеры, и стекло.

В дополнительном варианте осуществления для обнаружения или диагностики связанных с β-амилоидами заболеваний биологический образец, включающий ткань, биологические жидкости организма, такие как спинномозговая жидкость (СМЖ), кровь, плазма крови, сыворотка, моча и т.п., содержит и приводится в контакт с подходящим количеством первого антитела для продуцирования иммунного комплекса. Контакт, как правило, включает добавление образца к твердой матрице, покрытой первым антителом. Комплекс, полученный в результате приведения образца в контакт с первым антителом, отделяют от образца при помощи элюирования. Однако можно использовать и другие способы извлечения. Выделенный комплекс приводят в контакт по меньшей мере с одним вторым антителом, направленным на антигенную детерминанту на антигене и способным связывать антиген в комплексе. Антигенная детерминанта, на которую направлено второе антитело, может быть той же детерминантой, на которую направлено первое антитело из-за полиэпитопной природы антигенного фрагмента. Либо первое, либо второе антитело могут быть выполнены с возможностью обнаружения с использованием любой из меток, описанных выше. В предпочтительном варианте осуществления второе антитело является обнаруживаемым. Присутствие обнаруживаемого антитела, связанного с комплексом, состоящим из антигена, связанного с первым и вторым антителами, можно легко обнаружить с помощью известных в данной области методик. Путем сравнения результатов, полученных для биологического образца, с результатами, полученными для контрольного образца, можно определить наличие или уровни измененного Аβ3pE или его фрагментов.

Способы *in vivo*.

Аспекты изобретения относятся к способу предотвращения, снижения интенсивности, лечения и/или уменьшения отложения бета-амилоидов при связанных с бета-амилоидами патологических состояниях, включающему введение требующему этого субъекту антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, в терапевтически эффективном количестве. Дополнительные аспекты изобретения включают фармацевтическую композицию для предотвращения, снижения интенсивности, лечения и/или уменьшения амилоидных отложений при связанных с бета-амилоидами патологических состояниях, причем указанная фармацевтическая композиция содержит антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе. Способы по настоящему изобретению включают введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества одного или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе.

В одном аспекте изобретение относится к способам предотвращения, снижения интенсивности, лечения и/или уменьшения отложения бета-амилоидов при патологических состояниях, характеризующихся образованием бляшек, содержащих бета-амилоидный белок, у людей, причем способ включает введение, предпочтительно периферически, нуждающемуся в таком лечении человеку терапевтически или профилактически эффективного количества антитела согласно изобретению или его иммунореактивного фрагмента, которое специфически связывается с Аβ3pE человека. В еще одном аспекте изобретение относится к способам ингибирования образования амилоидных бляшек и/или способам устранения амилоидных бляшек у людей, причем способ включает введение нуждающемуся в таком ингибировании или очистке субъекту-человеку эффективного количества антитела согласно изобретению, причем антитело связывает пептид Аβ3pE в головном мозге и индуцирует клиренс измененного Аβ3pE в головном мозге. В дополнительных аспектах изобретение относится к таким гуманизированным антителам, включая их иммуноэффективные области, и к способам их получения.

Субъект, нуждающийся в этом, представляет собой человека, страдающего или предрасположенного к патологическому состоянию, характеризующемуся образованием бляшек, содержащих бета-амилоидный белок. В одном варианте осуществления патологическое состояние представляет собой болезнь Альцгеймера. В других вариантах осуществления патологическое состояние представляет собой деменцию, связанную с трисомией 21 (синдром Дауна), болезнь диффузных телец Леви, миозит с включениями, церебральную амилоидную ангиопатию и наследственную церебральную геморагию с амилоидозом голландского типа (HCHWA-D).

Гуманизированное антитело представляет собой антитело отличного от человека вида, белковые последовательности которого были модифицированы для увеличения их сходства с вариантами антитела, продуцируемыми естественным образом у людей. Как правило, белковая последовательность гуманизированного антитела по существу идентична последовательности человеческого варианта, за исключением нечеловеческого происхождения некоторых или всех его определяющих комплементарность областей (CDR), которые отвечают за способность антитела связываться со своим целевым антигеном. Каркасные области переменных областей заменяют соответствующими человеческими каркасными областями, оставляя нечеловеческие CDR по существу интактными. В некоторых случаях гуманизированные антитела действительно имеют небольшое количество замен в одной или более нечеловеческих областях CDR для сохранения аффинности связывания и/или константы диссоциации нечеловеческого антитела.

Гуманизированное антитело также относится к антителу, содержащему человеческий каркас, по меньшей мере один CDR нечеловеческого антитела, в котором любая константная область по существу идентична человеческой константной области иммуноглобулина, т.е. по меньшей мере на около 85, 90%, предпочтительно по меньшей мере около 95% или на 98% идентична. Таким образом, все части гуманизированного антитела, за исключением одной или более CDR, по существу идентичны соответствующим частям последовательности человеческого иммуноглобулина. Например, гуманизированный иммуноглобулин, как правило, не будет включать химерное антитело с мышинной переменной областью/человеческой константной областью.

Гуманизированные антитела обладают по меньшей мере тремя потенциальными преимуществами по сравнению с нечеловеческими и химерными антителами для применения в лечении человека: 1) поскольку эффективная часть является человеческой, она может лучше взаимодействовать с другими частями иммунной системы человека (например, активировать макрофаги для устранения бляшек); 2) человеческая иммунная система не должна распознавать каркасную или C-область гуманизированного антитела как чужеродную, и, следовательно, образование антител на такое введенное антитело должен быть меньше, чем на полностью чужеродное нечеловеческое антитело или частично чужеродное химерное антитело; и 3) вводимые нечеловеческие антитела, по имеющимся данным, имеют период полужизни в кровотоке человека, который короче периода полужизни человеческих антител.

В способе лечения и предотвращения патологических состояний, характеризующихся образованием бляшек, содержащих бета-амилоидный белок, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (включая иммунореактивные фрагменты) по изобретению вводят субъекту, подверженному риску развития или проявляющему связанные с бета-амилоидом симптомы или патологию, такую как клиническая или доклиническая стадия болезни Альцгеймера, деменция, связанная с синдромом Дауна, или клиническая или доклиническая стадия амилоидной ангиопатии, с использованием стандартных методов введения. Предпочтительно введение осуществляется периферически (т.е. без введения в центральную нервную систему) путем внутривенного, внутривенного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, сублингвального введения или с использованием суппозитория. Хотя антитела или их связывающие фрагменты можно вводить непосредственно в желудочковую систему, спинномозговую жидкость или паренхиму головного мозга, и способы доставки в эти области хорошо известны в данной области техники, нет необходимости использовать эти более сложные процедуры. Антитела или их связывающие фрагменты по изобретению эффективны при введении более простыми техниками, которые зависят от системы периферического

кровообращения. Преимущества настоящего изобретения включают способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента оказывать благоприятные эффекты, даже если они не представлены непосредственно в самой центральной нервной системе.

Фармацевтические композиции для введения выполнены с возможностью соответствия выбранному способу введения, и фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как диспергирующие агенты, буферы, поверхностно-активные вещества, консерванты, солюбилизующие агенты, изотонические агенты, стабилизирующие агенты и т.п., в зависимости от ситуации. Издание Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, последнее издание, включенное в данный документ посредством ссылки, предоставляет сборник методов изготовления, которые обычно известны практикующим врачам.

Особенно полезно изменять характеристики растворимости антител по изобретению, что делает их более липофильными, например, путем их инкапсуляции в липосомы или блокирования полярных групп.

Предпочтительной является периферическая системная доставка путем внутривенной, внутривенной или подкожной инъекции. Подходящие носители для таких инъекций являются простыми. Однако, кроме того, введение также может осуществляться через слизистые оболочки с помощью назальных аэрозолей или суппозиториев. Приемлемые составы для таких способов введения хорошо известны и, как правило, включают поверхностно-активные вещества, которые облегчают перенос через мембрану. Такие поверхностно-активные вещества часто получают из стероидов или они представляют собой катионные липиды, такие как N-[1-(2,3-диолеил)пропил-N,N,N-триметиламмонийхлорид (DOTMA), или различные соединения, такие как холестерин гемисукцинат, фосфатидилглицерин и т.п.

Концентрация гуманизованного антитела в составах от около 0,1 до около 15 или 20 мас.% выбрана преимущественно на основании объемов жидкости, значений вязкости и т.п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Таким образом, типичная фармацевтическая композиция для инъекций может содержать 1 мл стерильной воды с фосфатно-солевым буфером и 1-100 мг гуманизованного антитела по настоящему изобретению. Состав может быть стерилизован путем фильтрации после изготовления или иным образом сделан микробиологически приемлемым. Типичная композиция для внутривенной инфузии может иметь объем до 250 мл жидкости, такой как стерильный раствор Рингера, и концентрацию антител 1-100 мг на мл или более.

Для введения антитела доза находится в диапазоне от около 0,0001 до 100 мг/кг, предпочтительно от 0,01 до 75 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 0,02, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 мг/кг массы тела хозяина. В вариантах осуществления доза находится в диапазоне 0,01-10 мг/кг, или в диапазоне 0,1-15 мг/кг, или в диапазоне 0,1-20 мг/кг, или в диапазоне 0,1-30 мг/кг, или в диапазоне 0,1-40 мг/кг, или в диапазоне 0,1-50 мг/кг, или в диапазоне 0,1-60 мг/кг, предпочтительно по меньшей мере 1 мг/кг, по меньшей мере 5 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, по меньшей мере 20 мг/кг, по меньшей мере 30 мг/кг, по меньшей мере 40 мг/кг, по меньшей мере 50 мг/кг или по меньшей мере 60 мг/кг. В предпочтительном примере дозы могут составлять около 10 мг/кг, около 20 мг/кг, около 30 мг/кг, около 40 мг/кг, около 50 мг/кг, около 60 мг/кг или около 70 мг/кг. В особенно предпочтительном примере антитело вводят внутривенно в диапазоне доз от около 0,3 мг/кг до около 60 мг/кг. В иллюстративной схеме лечения антитело вводят внутривенно в дозе около 10 мг/кг, около 20 мг/кг, около 30 мг/кг, около 40 мг/кг, около 50 мг/кг или около 60 мг/кг.

Используемый в данном документе термин "около", когда он относится к измеряемому значению, такому как количество, означает колебания в пределах от $\pm 20\%$ до $\pm 0,1\%$, предпочтительно $\pm 15\%$ или $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, даже более предпочтительно $\pm 1\%$ и еще более предпочтительно $\pm 0,5\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,05\%$ или $\pm 0,01\%$ от указанного значения, если такие колебания допустимы.

Иллюстративная схема лечения включает введение один раз каждые две недели или один раз в месяц или один раз каждые 3-6 месяцев. В некоторых способах два или более моноклональных антитела с разной специфичностью связывания вводятся одновременно, в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в пределах указанных диапазонов. Антитело, как правило, вводят несколько раз. Интервалы между однократными дозами могут быть недельными, месячными или годовыми. Интервалы также могут быть нерегулярными, что определяется измерением концентраций антитела к АВ в крови у субъекта. Альтернативно, антитело можно вводить в виде композиции с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируются в зависимости от периода полужизни антитела у пациента. В целом, человеческие антитела демонстрируют самый длительный период полужизни, за которым следуют гуманизованные антитела, химерные антитела и нечеловеческие антитела.

Доза и частота введения могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении относительно малую дозу вводят с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые субъекты продолжают получать лечение в течение оставшейся части жизни. В терапевтических сферах

- f. SEQ ID NO: 56, 57, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 56, 58, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 56, 7, 3, 8, 5, и 6, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 1, 57, 3, 8, 5, и 6, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 56, 7, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 1, 57, 3, 4, 5, и 6, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 1, 58, 3, 4, 5, и 6, соответственно; или
- m. SEQ ID NO: 56, 2, 3, 4, 5, и 6, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает 3pE Aβ, предпочтительно человеческий 3pE Aβ.

Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, содержащее вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 20, или 21, или вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 10, 12, 14, 18, 22, 53, или 55.

Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, содержащее:

- a. вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22;
- b. вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;
- c. вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;
- d. вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- e. вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- f. вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- g. вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, и вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- h. вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;
- i. вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;
- j. вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 53; или
- k. вариательную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариательную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 55.

Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-3, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-4, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

Вариант осуществления 6 представляет собой выделенное моноклональное антитело, содержащее:

- a. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 38;
- b. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 39, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 38;
- c. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 52; или
- d. аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 39, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 54.

Вариант осуществления 7 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-6.

Вариант осуществления 8 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 7.

Вариант осуществления 9 представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор по варианту осуществления 8.

Вариант осуществления 10 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 11 представляет собой способ лечения патологического состояния, связанного с образованием бляшек, содержащих бета-амилоидный белок, у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-6 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 10.

Вариант осуществления 12 представляет собой способ по варианту осуществления 11, в котором патологическое состояние представляет собой болезнь Альцгеймера.

Вариант осуществления 13 представляет собой способ по варианту осуществления 11, в котором патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из деменции, связанной с трисомией 21 (синдром Дауна), болезни диффузных телец Леви, миозита с включениями, церебральной амилоидной ангиопатии и наследственной церебральной геморрагии с амилоидозом голландского типа (HCHWA-D).

Вариант осуществления 14 представляет собой способ уменьшения бляшек, связанных с болезнью Альцгеймера, у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-6 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 10.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ предотвращения активности нуклеации 3pE Aβ у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-6 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 10.

Вариант осуществления 16 представляет собой способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-6, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-6, при этом способ включает стадии, в которых: комбинируют моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Примеры

Изобретение можно лучше понять в свете приведенных ниже примеров, не имеющих ограничительного характера.

Пример 1. Получение моноклональных антител и процесс гуманизации.

Трех мышей линии Balb/c (Janvier Labs) примировали H2N-pEFRHDSGC-COOH (Eurogentec) (SEQ ID NO: 47) в полном адьюванте Фрейнда (Sigma; г. Сент-Луис, штат Миссури). Пептиды получали путем сочетания пептидов через СОН-концевой цистеиновый остаток с активированным малеимидом альбумином бычьей сыворотки (Life Technologies; г. Карлсбад, штат Калифорния) с использованием доступных в продаже наборов, таких как набор Imject Maleimide Activated BSA (Pierce; г. Рокфорд, штат Иллинойс) в соответствии с инструкциями производителя. Мышей стимулировали каждые две недели 100 мкг или 200 мкг связанного с BSA пептида, сначала в полном, а затем неполном адьюванте Фрейнда (Sigma).

Получение гибридомы и антител: для слияния отбирали мышью с самым высоким сывороточным титром, в то время как селезенки других мышей выделяли и замораживали в жидком азоте. На 4-й день перед слиянием или экстракцией селезенки всех мышей внутрибрюшинно стимулировали 100 мкг H2N-pEFRHDSGC-COOH (SEQ ID NO: 47), связанного с BSA (Merck; г. Кенильворт, штат Нью-Джерси) в солевом растворе. Клетки селезенки мыши сливали с клетками SP2/0 (ATCC; г. Манассас, штат Вирджиния) с помощью модифицированной процедуры, описанной в публикации Kohler и Milstein (Euro. J. Immunol., 1976; 292-295). Гибридомы высевали в 30 96-луночных планшетов и через 10 дней проводили прямой ИФА по 0,5 мкг/луночка несвязанного пептида Aβ 3pE-40 (AnaSpec; г. Фримонт, штат Калифорния). Положительные клетки тестировали на перекрестную реактивность (отсутствие) с 0,5 мкг/мл нанесенного пептида Aβ1-40 (AnaSpec) и сразу же субклонировали.

После слияния 17 клонов дали положительную реакцию в прямом анализе ИФА с человеческим синтетическим пептидом Aβ3pE-40 (SEQ ID NO: 40) и замораживали в жидком азоте.

Все гибридомы выращивали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Hyclone, Европа), добавки HFCS (2%) (Roche; Брюссель, Бельгия), 2% HT (Sigma), 1 mM пирувата натрия, 2 mM L-глутамин, пенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (50

мг/мл). Все продукты были доступны в продаже и приобретены у компании Life Technologies. Клетки инкубировали в увлажненном воздушном инкубаторе с 8% CO₂.

Прямой ИФА для селекции антител: ИФА для скрининга, используемый для обнаружения описанных выше антител Аβ 3pE-40, представлял собой прямой ИФА с 0,5 мкг/мл свободного человеческого пептида Аβ 3pE-40 (SEQ ID NO: 40), наносимого в течение ночи при 4°C на плоскодонные 96-луночные микротитрационные планшеты NUNC Maxisorp (Life Technologies) в 50 мкл/луночка покрывающего буфера (10 mM Tris, 10 mM NaCl и 10 mM NaN₃, pH 8,5).

На следующий день планшеты блокировали 75 мкл/луночка 0,1% казеина (Merck) в PBS в течение 60 мин при комнатной температуре для уменьшения неспецифического связывания. Затем добавляли 50 мкл супернатанта гибридомы и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После промывки связанные моноклональные антитела определяли при помощи 50 мкл/луночка овечьего антитела к IgG мыши, конъюгированного с пероксидазой хрена (Amersham-Pharmacia Biotech; Литтл Чалфонт, Соединенное Королевство) в течение 1 ч при 37°C. Оба реагента разводили в растворе 0,1% казеина/PBS. Планшеты промывали и 50 мкл раствора 0,42 mM 3,5,3',5'-тетраметилбензидина (Biorad), 0,003% (об./об.) H₂O₂ (Biorad) в 100 mM лимонной кислоты (Biorad; г. Геркулес, штат Калифорния). В качестве субстрата добавляли 100 mM гидрофосфата натрия (pH 4,3) (Biorad). Реакции позволяли протекать максимум 15 минут на шейкере для планшетов при комнатной температуре, после чего развитие окраски останавливали добавлением 50 мкл/луночка 2н. H₂SO₄ (Merck), и планшеты считывали на микропланшетном ридере при 450 нм (Thermomax, Molecular Devices). Перекрестную реактивность выбранных моноклональных антител с полноразмерным человеческим свободным Аβ 1-40 исследовали методом прямого ИФА, идентичным скрининговому анализу.

Из 17 реактивных к Аβ3pE-40 клонов отобрали BAMB31_1 для дополнительного определения характеристик на основании аффинности и селективности (ср. примеры 2 и 3). Было определено, что данное антитело имеет тяжелую цепь изотипа IgG1 и мышиную легкую каппа-цепь. Хотя мышинный Fc IgG1 имеет всего 70% идентичности последовательности и 76% сходства последовательности с мышинным Fc IgG2a, эти изотипы имеют разную активность и белковые профили. По сравнению с мышинным IgG2a, мышинный IgG1 имеет меньшую эффекторную функцию мышинового Fc и функцию комплемента из-за более слабого связывания с мышинными рецепторами FcγRI, FcγRIII и FcγRIV и мышинным C1q. Считается, что изотип является наиболее близким к активности человеческого IgG1, мышинный IgG2a связывается с мышинными рецепторами FcγRI, FcγRIII и FcγRIV, и мышинный C1q, тем самым обладая активностью комплемента, антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ), которая может способствовать устранению бляшек Аβ.

Последовательность тяжелой цепи BAMB31 изменяли с мышинового IgG1 на мышинный IgG2a для получения BAMB31_2a. Сохранение реактивности после клонирования V-области подтверждали методами ППР, описанными ниже.

Процесс гуманизации: исходное антитело BAMB31_2a (mIgG2a) гуманизировали с использованием процедуры, аналогичной Singh, et. al. (MAb 2015; 7(4): 778-91), за исключением CDR-H2, который определяли в соответствии с определением AbM (Martin, A.C., PNAS 86: 9268-9277, 1989) для этой работы. Вкратце, определяющие комплементарность области (CDR) идентифицировали в мышинных исходных последовательностях. Эти последовательности сравнивали с человеческими зародышевыми линиями и отбирали четыре человеческие тяжелые цепи зародышевой линии и два человеческих каркаса легкой цепи зародышевой линии, в которые были привиты мышинные CDR. Человеческие J-сегменты для VL и VH каждого исходного антитела были выбраны путем сравнения мышинных и человеческих последовательностей J-сегментов, чтобы максимизировать идентичность последовательностей. Молекулярная модель области Fv исходного мкАт была создана в MOE (CCG; г. Монреаль, Канада) с использованием параметров по умолчанию. Полученную модель исследовали графически для определения положений каркаса, которые потенциально важны для связывания и/или стабильности антитела. Были созданы библиотеки антител, в которых в дополнение к привитым CDR эти положения имеют человеческие/мышинные двоичные комбинации. В библиотеках каждую цепь с привитыми мышинными CDR соединяли с противоположной мышинной исходной цепью. Таким образом, только одна цепь была адаптирована к человеческому каркасу, а обратные мутации были определены на основании связывания антигена. Затем гуманизированные VH и VL объединяли с получением конечных антител-кандидатов.

Клоны библиотеки экспрессировали в виде Fab в E. coli и тестировали на связывание с пептидом посредством ИФА и сигналов, сравниваемых с полностью молекулой мышинового исходного антитела. Для секвенирования отбирали сигналы молекул, демонстрирующие связывание с более 80% молекулы мышинового исходного антитела. Анализировали последовательности, отбирали человеческие адаптированные тяжелые цепи и человеческие адаптированные легкие цепи для объединения и экспрессировали в виде моноклональных человеческих антител IgG1. Все гуманизированные пары VH/VL каждого антитела экспрессировали, очищали и оценивали на предмет связывания антигена, риска

иммуногенности EpiVax in silico, числа остатков, обратно мутировавших в мышиную последовательность, и биофизических свойств.

Результаты: для сохранения связывания исходного белка необходимо было обратно мутировать некоторые остатки мышинной последовательности. Сохранение связывания, риск иммуногенности EpiVax in silico и биофизические свойства не зависели от количества обратных мутаций к мышинным последовательностям, а от того, в каких положениях находились обратные мутации в мышиную последовательность. Репрезентативные результаты определения характеристик мкАт к HFA, полученные в данном анализе, показаны в табл. 2 и 3.

Таблица 2
Примеры результатов определения характеристик BAMB31 к HFA

Образец	Общее кол-во остатков, которые обратно мутировали в мышиную последовательность	Комбинированная оценка по V-области EpiVax	ЭХ (% мономера)	KD (M) от 1.17E-11 до 1.52E-09	Tonset (°C) 53,9-62,5	Tm1 (°C) 60,7-69,1	Tagg (°C) 61,7-70,6
Диапазон:	0-7	от -53,46 до -13,62	84-99				
BAMB246	Н/П	5,25	96	1.39E-11	60,7	67,4	69,4
BAMB611	0	-53,46	97	1.52E-09	62,5	69,1	70,6
BAMB612	4	-20,77	98	1.17E-11	62,1	66,7	67,6
BAMB613	4	-39,59	97	1.82E-11	59,3	65,4	66,4
BAMB614	3	-39,77	98	1.60E-11	61,8	66,6	67,6
BAMB630	7	-13,88	98	3.83E-11	58,4	64,6	64,7
BAMB631	4	-14,31	97	1.80E-11	58,8	64,4	65,0
BAMB623	5	-31,47	84	1.83E-11	54,8	62,0	62,7

Исходная химера человеческого IgG1 BAMB246.

Значения за пределами желаемого диапазона выделены жирным шрифтом: Общее количество остатков, который обратно мутировали в мышиную последовательность ≥ 5 ; Баллы риска по EpiVax для HC и LC > -10 ; Комбинированные баллы риска по EpiVax > -20 ; Значения % мономера по ЭХ $< 95\%$ kd (1/c) $>> 1.00E-04$; Значения KD (M) $> 2.50E-11$; Tonset (°C) < 60 ; Tm1 (°C) < 65 ; Tagg (°C) < 65 .

Снижение риска посттрансляционной модификации: исходное антитело и адаптированные к человеческому каркасу варианты содержали мотив с посттрансляционной модификацией деаминированием NG в HCDR2. Для решения этой потенциальной проблемы были созданы отдельные библиотеки для остатков N и G с использованием вырожденных олигонуклеотидов. В результате были созданы новые последовательности, в которых случайным образом вводили все 20 аминокислот для каждого положения. Каждую библиотеку проверяли на предмет сохранения связывания. Для секвенирования были отобраны варианты антител, демонстрирующих связывание, подобное связыванию исходных мышинных антител.

Результаты: после секвенирования мутанты с заменами с N на S и с N на G имели сопоставимое связывание с исходным мутантом. Перспективные варианты к HFA были клонированы и экспрессированы как IgG1 дикого типа (BAMB674) и IgG1 с точечными мутациями M37Y, S39T и T41E в области Fc (нумерация основана на последовательностях константной области тяжелой цепи Fc

IgG1 в GenBank, номер доступа AЕV43323), был обозначен как +YTE IgG1 (BAMB675). Известно, что такие мутации повышают аффинность к FcRn и увеличивают период полужизни в кровотоке (Properties of Human IgG1s Engineered for Enhanced Binding to the Neonatal Fc Receptor (FcRn), Dall'Acqua WF., JBC, 2006). Характеристики BAMB674 и BAMB675 показаны в табл. 3.

Таблица 3
Характеристики BAMB674 и BAMB675

Свойства	BAMB674	BAMB675
Изотип	IgG1 ДТ	+YTE IgG1
FW HC	IGHV1-46*03	IGHV1-46*03
В положениях FW HC необходимы мышинные остатки	M48I, M70L	M48I, M70L
Уменьшение мотивов NG CDR2 HC	N55S	N55S
FW LC	IGKV2-30*01	IGKV2-30*01
В положении FW LC необходим мышинный остаток	V109L	V109L
Уменьшение мотивов NG CDR1 LC	NG→RA	NG→RA
KD (пМ)	25,4	25,7
Tonset	62,9 °C	57,7 °C
Tm1	67,3 °C	64,1 °C
Tagg	68,4 °C	67,7 °C
% Мономера по ЭХ	97	98
Стабильность при высокой концентрации >2 недель	>100 мг/мл	>100 мг/мл

Таблица 3а

Термостабильность

Образец	Tonset (°C), средн. знач.	Tm1 (°C), средн. знач.	Tagg (°C), средн. знач.	Tonset, станд. откл.	Tm1, станд. откл.	Tagg, станд. откл.
Контрольное мкАт	63,8	69,8	80,6	0,092	0,016	0,001
BAMB700	61,4	67,4	70,5	0,228	0,178	0,168
BAMB701	59,1	65,2	69,5	0,263	0,155	0,559
BAMB674*	62,9	67,3	68,4	-	-	-

* N=1.

Пример 2: Исследование термостабильности.

Для вариантов BAMB31 с адаптированным человеческим каркасом термостабильность оценивали с помощью нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (NanoDSF) для измерения начала температуры плавления (Tonset), температуры первого фазового перехода плавления (Tm1) и температуры первоначального обнаружения агрегации (Tagg). Данные для некоторых вариантов приведены в табл. 2 (столбцы 6-8), табл. 3 (строки 10-12) и табл. 3а.

Материалы и способы: термостабильность образца определяют с помощью автоматического прибора Promeeus. Измерения проводят путем загрузки образца в 24-капиллярную матрицу из 384-луночного планшета для образцов. Для каждого образца выполняют повторные измерения. Пользовательский интерфейс Promeeus NanoDSF (вкладка Melting Scan) используется для настройки экспериментальных параметров анализа. Термическое сканирование типичного образца IgG охватывает диапазон от 20 до 95°C со скоростью 1,0°C/мин. Типичная концентрация образцов находится в диапазоне от 0,3 до 1 мг/мл. Собственную флуоресценцию молекулы при 330 и 350 нм используют для отслеживания разворачивания во время линейного изменения температуры и регистрируют в виде изменения интенсивности флуоресценции в зависимости от времени. Это называется результатами термического сканирования (Tm). Параллельно с этим, используя технологию обратного отражения, прибор определяет начало агрегации (Tagg) в течение линейного изменения температуры. Таким образом, метод NanoDSF позволяет одновременно измерить конформационную и коллоидную

стабильность перспективных кандидатов, которые часто отслеживают в качестве показателей долгосрочной стабильности образца в различных условиях.

Пример 3. Оценка риска иммуногенности EpiVax *in silico*.

Для прогнозирования связывания ГКГС класса II использовали программное обеспечение EpiMatrix (EpiVax Inc.) для проведения *in silico* анализа V-областей мкАт к Аβ 3pE. Программное обеспечение анализирует последовательные 9-меры аминокислот для идентификации потенциальных последовательностей связывания HLA класса II. База данных включает наиболее распространенные типы HLA, охватывающие приблизительно 95% человеческой популяции. Если рецептор HLA антигенпрезентирующей клетки связывает пептидный агрегат, тогда другая сторона этого пептида (эпитоп) может связывать эффекторные Т-клетки или регуляторные Т-клетки, что, в свою очередь, может привести к стимуляции или подавлению иммунного ответа против белка, несущего этот эпитоп. Программное обеспечение генерирует балл связывания агрегата, который может быть скорректирован с учетом спрогнозированного связывания регуляторных Т-клеток. Баллы нормализованы относительно размера белка и количества событий связывания, что дает выходные данные, указывающие на прогнозируемую иммуногенность белка.

Пример 4. Аналитическая характеристика очищенных мкАт.

Концентрацию белка для каждого очищенного мкАт определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм на спектрофотометре NanoDrop1000 или многоканальном спектрофотометре Trinean DropSense96 и рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции, основанного на аминокислотной последовательности.

ЭХ-ВЭЖХ очищенных антител выполняли, прогоняя образцы на колонке TOSOH TSKgel BioAssist G3SWx1 в 0,2 М натрия фосфата, pH 6,8 при 1 мл/мин на Waters Alliance HPLC в течение 20 мин. Элюат контролировали по поглощению при 280 нм. Последовательности показаны в табл. 2 и 3.

Пример 5. Измерение кинетики связывания и аффинности.

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) представляет собой метод безмаркерного обнаружения, используемый для исследования биомолекулярных взаимодействий. Контроль небольших изменений массы на поверхности сенсора, при этом данный прямой анализ связывания в реальном времени обеспечивает качественные и количественные данные о взаимодействии между биомолекулами; т.е. определение равновесных констант связывания (аффинность, K_D) и кинетических констант скорости (k_a/k_d ; скорость ассоциации комплекса k_a и скорость диссоциации комплекса k_d). Этот способ можно использовать в исследованиях взаимодействий белок-белок и белок-нуклеиновая кислота, а также взаимодействий между белками и малыми молекулами. В данном случае исследовали взаимодействия между 3pE-специфическими антителами и человеческими пептидами Аβ3pE-40 (SEQ ID NO: 40) или Аβ3pE-28 (SEQ ID NO: 42), человеческими пептидами Аβ1-40 (SEQ ID NO: 41) или Аβ1-28 (SEQ ID NO: 43) и пептидами Аβ3pE-28 грызуна (SEQ ID NO: 45 и 46).

Материалы и способы.

ППР: набор для захвата антител мыши от GE Healthcare использовали для исследования аффинности BAMB31_2a (mIgG2a) в отношении пептида Аβ-3pE-40 (SEQ ID NO: 40). В качестве контрольных антител включали J&JPRD/Аβ/pE3/1 mIgG2a (описанные в публикации патента США № 2018/0142011) и mE8c mIgG2a (описанные в US9944696 и US8679498). Иммобилизацию антимышиного антитела выполняли посредством сочетания с аминокислотной группой на сенсорном чипе CM5 в соответствии с протоколом производителя. Затем представляющее интерес антитело (1 мкг/мл) захватывали антимышиным антителом до уровня 300 RU с последующей инъекцией человеческого пептида Аβ 3pE-40 (SEQ ID NO: 40) в различных концентрациях (3,125 нМ, 6,25 нМ, 12,5 нМ, 25 нМ и 50 нМ), разведенного в подвижном буфере (20 мМ фосфатного буфера с 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl и 0,05% поверхностно-активного вещества P20 (Tween™ 20)). Поверхность регенерировали 10 мМ глицина гидрохлоридом при pH 1,7 в течение по меньшей мере 180 с и дополнительных 60 с. В качестве отрицательного контроля использовали человеческий пептид Аβ (1-40) (SEQ ID NO: 41).

Измерения аффинности проводили с помощью оптического биосенсора T200 (Biacore®). Кинетический анализ проводили в соответствии с моделью связывания с аппроксимацией 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (версия 2.0).

В некоторых случаях аффинность связывания и специфичность мкАт к Аβ 3pE измеряли методом ППР, выполняемого с использованием различных инструментов (Biacore T200, Biacore 8K или MASS-2 (Biacore, Inc.)) и поверхностей биосенсора, содержащего антитела к человеческому или мышинному иммуноглобулину. Антитела к человеческому или мышинному иммуноглобулину ковалентно связывали с поверхностью сенсорных чипов CM4 или CM5 (GE Healthcare), используя инструкции изготовителя по химии сочетания с аминокислотной группой. Представляющие интерес антитела захватывали сенсорным чипом, содержащим антитела к человеческому или мышинному иммуноглобулину, в концентрации 300-400 RU с последующей инъекцией пептидов или белков Аβ (примеры: человеческий Аβ 3pE-40 (SEQ ID NO: 40), Аβ 3pE-28 (SEQ ID NO: 42), рандомизированный Аβ 3pE-28 (SEQ ID NO: 44), Аβ 1-28 (SEQ ID NO: 43), мышинный Аβ 3pE-28 (SEQ ID NO: 46) или фибронектин) в различных концентрациях в буферном

солевом растворе HEPES, содержащем 0,005% поверхностно-активного вещества P20 (Tween™ 20). Поверхность регенерировали путем 2 импульсных инъекций 30 мкл 10 mM Gly pH 1,5 при 100 мкл/мин. Приведенные данные представляют собой разность сигнала ППР между проточной ячейкой, содержащей захваченное антитело и эталонной ячейкой, не содержащей захваченного антитела. Дополнительно погрешность, вносимую прибором в сигнал, устраняли, вычитая данные пустой инъекции из сигнала с вычтенным эталонным сигналом. Если применимо, данные анализировали, аппроксимируя фазы ассоциации и диссоциации при всех концентрациях (глобальная аппроксимация) моделью связывания 1:1, используя программное обеспечение Biaevaluation (Biacore, Inc.). В противном случае данные оценивали качественно на наличие/отсутствие связывания.

Иммуногистохимический анализ фиксированного формалином и залитого парафином головного мозга: для иммуногистохимического анализа после депарафинизации и повторной гидратации срезов проводили извлечение антигена посредством инкубации микропрепаратов головного мозга трансгенных мышей в течение 10 мин в муравьиной кислоте (70% в дистиллированной воде) и блокировали активность эндогенной пероксидазы с помощью 3% пероксида водорода (ДАКО; г. Глоструп, Дания, S2023). Срезы инкубировали в течение 1 ч с BAMB674, BAMB675, hE8L, R17L, R17, CI-C7, B12L, антителом I или антителом II (последние семь антител были ранее описаны в US9944696B2 и US8679498B2) в различных концентрациях (рабочая концентрация: 2, 0,1-0,05-0,025 мкг/мл) в разбавителе антитела с компонентами снижения фоновой окраски (ДАКО, S3022)). После интенсивной промывки меченное ПХ человеческое вторичное антитело (PI-3000, Vector labs; Бурлинггейм, Калифорния - 1/500 в разбавителе антител (ДАКО, S0809)) наносили на микропрепараты в течение 1 ч с последующим хромогенным мечением 3,3-диаминобензидином (DAB) (ДАКО, K3468). Микропрепараты подвергали контрокрашиванию гематоксилином, дегидратировали и переводили в постоянный препарат путем заключения в Vectamount (H-5000, Vector Labs).

Результаты: кинетический анализ моноклонального антитела BAMB31_2a (mIgG2a) подтвердил аффинность связывания с пептидом Aβ3pE-40 (SEQ ID NO: 40). При применении пептида Aβ1-40 человека (SEQ ID NO: 41) в концентрациях до 50 нМ не было обнаружено связывания. Сенсограмма (кинетика единичного цикла), демонстрирующая связывание BAMB31_2a (mIgG2a) с пептидом Aβ3pE-40 человека (SEQ ID NO: 40), проиллюстрирована на фиг. 1. В качестве молекул для сравнения в одном и том же анализе оценивали J&JPRD/Aβ/pE3/1 mIgG2a и mE8c mIgG2a (фиг. 2), а BAMB31 по сравнению с mE8c и J&JPRD/Aβ/pE3/1 продемонстрировало более высокую аффинность. Равновесная константа связывания (аффинность, K_D) и кинетические константы скорости (k_a/k_d) показаны в табл. 4.

Таблица 4

Кинетика J&JPRD/Aβ/pE3/1, BAMB31 и mE8c mIgG2a				
Образец		k_a (1/M*c)	k_d (1/c)	K_D (пМ)
J&JPRD/Aβ/pE3/1 (mIgG2a)	Среднее	1.12E+05	9.37E-05	853
	Станд. откл.	1.48E+04	1.53E-05	201
BAMB31 (mIgG2a)	Среднее	9.30E+05	4.94E-05	53
	Станд. откл.	6.01E+03	3.97E-06	5
mE8c (mIgG2a)	Среднее	3.36E+05	3.20E-05	96
	Станд. откл.	1.05E+04	7.27E-06	25

Кинетический анализ мкАт к HFA BAMB31 (BAMB674 и BAMB675) при снижении риска деамидирования NG CDR2 HC показал сохраненную аффинность связывания с пептидом Aβ3pE-28 (SEQ ID NO: 42) по сравнению с исходным антителом BAMB31_2a (mIgG2a) и исходным антителом BAMB246 (химера IgG1 человека). Равновесная константа связывания (аффинность, K_D) и кинетические константы скорости (k_a/k_d) показаны в табл. 5.

По сравнению с ранее описанными гуманизированными 3pE-специфическими антителами hE8L, R17L, R17, CI-C7, B12L, антителом I и антителом II (ранее описанными в US 9944696 B2 и US 8679498 B2), аффинности данных молекул BAMB31 к HFA выше, как показано в табл. 5.

Таблица 5

Кинетика связывания 3pE Aβ для молекул ВАМВ31 к НФА и mE8c к НФА				
Образец	N	ka (1/M*c)	kd (1/c)	K _D (пМ)
ВАМВ675	9	3.24E+06	8.24E-05	25,7
ВАМВ674	9	3.27E+06	8.32E-05	25,4
ВАМВ246 (человеческое химерное исходное антитело)				
ВАМВ31_2a (исходный mIgG2a)	1	2.89E+06	7.97E-05	27,5
Антитело I	5	9.86E+05	1.84E-04	228,0
Антитело II	5	1.43E+06	1.02E-04	82,0
B12L	1	2.81E+05	1.25E-04	445,0
C1-C7	2	1.46E+05	2.63E-04	1810
hE8L	2	5.07E+05	6.36E-05	127,0
R17L	2	3.21E+05	3.31E-04	1030
R17	2	1.28E+05	7.43E-04	5800
Человеческое химерное mE8c	4	7.02E+05	≤ 6.44e-5	≤78,0
Исходное mIgG2a mE8c	4	7.25E+05	≤ 6.46e-5	≤89,0

Человеческие химерные антитела имеют мышинные вариабельные области в константной области IgG1 человека.

Таблица 5а

Сравнение аффинности связывания

Образец	ka (1/M*c)	kd (1/c)	K _D (М)
ВАМВ700	2.88E+06	9.86E-06	3.42E-11
ВАМВ701	3.01E+06	9.47E-05	3.14E-11
ВАМВ674	3.39E+06	1.36E-04	4.01E-11
ВАМВ675	3.74E+06	1.66E-04	4.43E-11
Контрольное мкАт	4.11E+06	1.56E-04	3.79E-11

Диапазон концентраций НУ-3pE-бета-амилоид от 0,6 до 4,5 нМ.

Более высокая аффинность, измеренная методом ППР, также приводила к улучшению связывания бляшек. Выполняли серию разведений первичных антител посредством иммуногистохимического анализа на срезах головного мозга трансгенной мыши. Все антитела давали видимое мечение бляшек в концентрации 2 мкг/мл, хотя и в разной степени. При концентрации 0,1 мкг/мл антитела С1-С7 и R17L не давали видимого мечения бляшек в соответствии с низкой аффинностью, измеренной методом ППР. При концентрации 0,05 мкг/мл ВАМВ674 и ВАМВ675 демонстрируют мечение бляшек, в то время как мечение бляшек в данной концентрации визуально отсутствует для молекул для сравнения (фиг. 3). При концентрации 0,025 мкг/мл видимое мечение бляшек (почти полностью) отсутствует для всех протестированных молекул.

В заключение можно отметить, что данные иммуногистохимического анализа подтверждают данные ППР, демонстрирующие более высокую аффинность ВАМВ674 и ВАМВ675 по сравнению с молекулами для сравнения.

ВАМВ246 (химера IgG1 человека) и существующие мкАт к НФА ВАМВ31 (ВАМВ674 и ВАМВ675) имели >3 логарифма селективности по отношению к высокомолекулярному мышинному пептиду Aβ 3pE-28 (SEQ ID NO: 46) и >5 логарифмов селективности по отношению к фибронектину, пептиду Aβ 1-28 (SEQ ID NO: 43) и пептиду Aβ 3pE-28 с рандомизированными аминокислотами 3-9 (рандомизированный 3pE-28) (SEQ ID NO: 44). Результаты селективности и равновесная константа связывания (аффинность, K_D) и кинетические константы скорости (k_a и k_d) для родственных пептидов и белка показаны в табл. 6.

Таблица 6
Кинетика селективного связывания ВАМВ246 (химера IgG1 человека) и мкАт,
к НФА с родственными мишенями

Образец	Пептид/белок	ka (1/М*с)	kd (1/с)	K _D (М)	Кратность селективности	
ВАМВ24	мышинный Аβ 3pE-28	1.02E+04	4.04E-04	3.96E-08	3143	
	фибронектин	отсутствие связывания до 1,2 мкМ		>1.20E-06	>95000	
	6	человеческий Аβ 1-28	отсутствие связывания до 1,2 мкМ		>1.20E-06	>95000
	Рандомизированный 3pE-28	отсутствие связывания до 1,2 мкМ		>1.20E-06	>95000	
ВАМВ67	мышинный Аβ 3pE-28	7.40E+03	3.38E-04	4.55E-08	1791	
	фибронектин	отсутствие связывания до 1,2 мкМ		>1.20E-06	>47000	
	4	человеческий Аβ 1-28	отсутствие связывания до 1,2 мкМ		>1.20E-06	>47000
	Рандомизированный 3pE-28	отсутствие связывания до 1,2 мкМ		>1.20E-06	>47000	
ВАМВ67	мышинный Аβ 3pE-28	4.68E+03	3.33E-04	7.75E-08	3014	
	фибронектин	отсутствие связывания до 1,2 мкМ		>1.20E-06	>46000	
	5	человеческий Аβ 1-28	отсутствие связывания до 1,2 мкМ		>1.20E-06	>46000
	Рандомизированный 3pE-28	отсутствие связывания до 1,2 мкМ		>1.20E-06	>46000	

Рандомизированный 3pE-28 представляет собой человеческий пептид Аβ 3pE-28 с рандомизированными аминокислотами 3-9.

Кратность селективности определяли делением KD из таблицы 4 на KD из таблицы 3.

При K_D ≥ 1.20E-06 (М) не было обнаружено связывания антигена до максимальной протестированной концентрации 1,2 мкМ.

Аффинности связывания FcRn для антитела ВАМВ31 к НФА на IgG1 дикого типа (ВАМВ674) и изоформе +YTE IgG1 (ВАМВ675) показаны в табл. 7. Аффинность мкАт +YTE (ВАМВ675) к FcRn человека и яванского макака в ~3 раза выше по сравнению с IgG1 дикого типа (ВАМВ674), которое транслировалось в более длительный период полужизни антитела +YTE в исследовании фармакокинетики яванского макака (фиг. 11).

Таблица 7
Аффинности связывания FcRn в сравнении с мкАт дикого типа и +YTE IgG1 к НФА

Образец	FcRn	K _D (М)
Контрольный IgG1	Человек	4.43E-07
Контрольный IgG1	Яванский макак	4.30E-07
ВАМВ674	Человек	3.49E-07
ВАМВ674	Яванский макак	2.68E-07
ВАМВ675	Человек	1.11E-07
ВАМВ675	Яванский макак	8.64E-08

Значения KD (М) были усреднены по 5-6 независимым повторностям.

Пример 6. Сэндвич-ИФА для тестирования перекрестной реактивности.

Для выбранного моноклонального антитела к Аβ3pE ВАМВ31 оценивали перекрестную реактивность с Аβ3pE-40 грызуна (SEQ ID NO: 45) и человеческим Аβ1-40 (SEQ ID NO: 41), Аβ1-42 (SEQ ID NO: 48), Аβ11pE-40 (SEQ ID NO: 49) и Аβ11pE-42 (SEQ ID NO: 50) с использованием

синтетических пептидов. Комбинацию BAMB31+JRF/cAβ40/28-HRPO использовали для исследования перекрестной реактивности с Aβ1-40 (SEQ ID NO: 41), Aβ11pE-40 (SEQ ID NO: 49) и Aβ3pE-40 грызуна (SEQ ID NO: 45), а комбинацию BAMB31+JRF/cAβ42/26-HRPO использовали для исследования перекрестной реактивности с Aβ1-42 (SEQ ID NO: 48) и Aβ11pE-42 (SEQ ID NO: 50). Тестировали концентрации до 10000 пг/мл.

Материалы и способы: стандарты растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (Sigma) в концентрации 0,1 мг/мл и хранили при -80°C. Для применения в ИФА пептиды дополнительно разводили в 0,1% казеине в PBS до 1 пг/мл. Планшеты с девятью шестью лунками (планшеты Maxisorb для ИФА; NUNC) покрывали в течение ночи при 4°C моноклональными антителами BAMB31_1 в концентрации 1,5 мкг/мл в покрывающем буфере. На следующий день планшеты промывали и блокировали 0,1% казеином в PBS в течение 1-4 ч при комнатной температуре. Стандарты инкубировали в течение ночи при 4°C вместе с мечеными HRPO вторичными антителами (JRF/cAβ40/28-HRPO или JRF/cAβ42/26-HRPO). После инкубации в течение ночи планшеты промывали, а анализ проводили с помощью набора субстратов для EIA с перекисью и TMB (Biorad) в соответствии с рекомендациями производителя.

Результаты: было показано, что BAMB31 имеет селективное связывание с Aβ3pE-40 (SEQ ID NO: 40) и Aβ3pE-42 (SEQ ID NO: 51) и не имеет обнаруживаемой перекрестной реактивности с человеческим Aβ1-40 (SEQ ID NO: 41), человеческим Aβ1-42 (SEQ ID NO: 48), Aβ3pE-40 грызуна (SEQ ID NO: 45) и человеческим AβpE11-40 (SEQ ID NO: 49) и AβpE11-42 (SEQ ID NO: 50) в концентрациях до 10 нг/мл (фиг. 4).

Пример 7. Иммуногистохимический анализ для исследования реактивности антитела к бляшкам в ткани головного мозга трансгенной мыши и человека с БА.

Реактивность антител к бляшкам исследовали как в фиксированной формалином и залитой парафином (FFPE), так и в криоконсервированной ткани головного мозга.

Материалы и способы.

Фиксированный формалином и залитый парафином головной мозг: для иммуногистохимического анализа после депарафинизации и повторной гидратации срезов проводили извлечение антигена посредством инкубации микропрепаратов головного мозга трансгенных мышей в течение 10 мин в муравьиной кислоте (70% в дистиллированной воде) и блокировали активность эндогенной пероксидазы с помощью 3% перекиси водорода (DAKO, г. Глоструп, Дания, S2023). Срезы инкубировали в течение 1 ч с BAMB246 (химера huIgG1), BAMB674 или BAMB675 (рабочая концентрация: 4 мкг/мл в разбавителе антитела с компонентами снижения фоновой окраски (DAKO, S3022)). После интенсивной промывки на микропрепараты наносили меченные ПХ античеловеческое вторичное антитело (PI-3000, Vector labs-1/500 в разбавителе антител (DAKO, S0809)) в течение 1 ч с последующим хромогенным мечением 3,3-диаминобензидином (DAB) (DAKO, K3468). Микропрепараты подвергали контрокрашиванию гематоксилином, дегидратировали и переводили в постоянный препарат путем заключения в Vectamount (H-5000, Vector Labs).

Криоконсервированный головной мозг: образцы головного мозга человека быстро замораживали, нарезали при помощи криостата (толщина 20 мкм) и хранили при -80°C перед использованием. Срезы сушили при комнатной температуре с последующей фиксацией формалином, блокированием эндогенной пероксидазы 3% перексидом водорода (DAKO, г. Глоструп, Дания, S2023) и блокированием в течение 1 ч в PBS1x+0,3% Triton X-100 и 10% нормальной козьей сыворотке (DAKO, X0907). На срезы наносили первичное антитело pE3/16 (2 мкг/мл в разбавителе антитела с компонентами снижения фоновой окраски (DAKO, S3022)) на 1 ч. После интенсивной промывки микропрепараты инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена антимышиным вторичным антителом (Envision, DAKO, K4000) с последующим мечением хромогенным DAB (DAKO, K3468). Микропрепараты подвергали контрокрашиванию гематоксилином, дегидратировали и заключали в органическую среду для заливки (Vectaarm, Vector labs). Визуализацию проводили с помощью прибора Hamamatsu Nanoscomer (Hamamatsu Photonics; г. Сизуока, Япония).

Результаты: реактивность BAMB264 (человеческая химера IgG1), а также BAMB674 и BAMB675 была продемонстрирована на FFPE ткани трансгенных мышей (фиг. 5A-5F). Более того, BAMB31_2a (mIgG2a) продемонстрировал значительное мечение бляшек в криоконсервированной ткани головного мозга при БА (фиг. 6). Значительную часть бляшек, обнаруженных при помощи антитела 4G8, также поместили BAMB31 в замороженных срезах человеческого головного мозга (фиг. 5A-5F).

Пример 8. Концентрации антител в сыворотке после введения трансгенным мышам.

Исследовали концентрации антител в сыворотке после лечения BAMB31 и молекулой для сравнения mE8c.

Материалы и способы: старые трансгенные мыши, экспрессирующие повышенные уровни человеческих пептидов Aβ42 и Aβ40, (возраст 22-23 месяца) получали одну внутрибрюшинную (в/б) инъекцию 20 мг/кг mE8c mIgG2a, BAMB31_2a (mIgG2a) или антитела изотипического контроля mIgG2a (n=5 на группу лечения). После введения антител цельную кровь собирали в промежуточные моменты времени (24 и 48 ч после введения) через большую подкожную вену и посредством прокола

орбитального синуса при умерщвлении (4 день после введения) в пробирки для взятия образцов MICROVETTE® (100Z и 300Z, соответственно; Sarstedt; г. Нумштадт, Германия). Собранную цельную кровь инкубировали при комнатной температуре в течение 1-2 ч, а затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин при 4°C для выделения сыворотки из сгустка крови. Концентрации антител в сыворотке определяли с помощью аллотип-специфического иммуноферментного анализа (ИФА). Для этого планшеты с плоским дном Nunc MaxiSorp™ (Thermo Scientific; г. Уолтем, штат Массачусетс, США) покрывали в течение ночи 1,5 мкг/мл мышинового моноклонального антитела к IgG2a(A) (BD Biosciences; г. Сан-Хосе, штат Калифорния) при комнатной температуре. Стандартные образцы антител mE8c mIgG2a, BAMB31_2a (mIgG2a) и mIgG2a изотипического контроля готовили по отдельности в концентрации 1 мкг/мл в блокирующем буфере (1% BSA в PBS+0,05% Tween-20) и дополнительно разбавляли до 0,1 нг/мл в блокирующем буфере. После промывки (PBS+0,05% Tween-20) образцы блокировали блокирующим буфером в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем стандарты и образцы предварительно разведенной сыворотки инкубировали в покрытых планшетах MAXISORP™ в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации образца планшеты промывали и инкубировали с аффинно очищенными конъюгированными с пероксидазой козьими анти-мышинными антителами IgG (специфичными к Fc γ подкласса 2a) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали и проявляли путем добавления в лунки набора субстратов пероксидазы TMB для ИФА (1-стадийный, Pierce). Проявление цвета останавливали через 2 мин путем добавления 2 н. H₂SO₄ в лунки и считывания планшетов при 450 нм с использованием многорежимного планшетного ридера EnVision (Perkin Elmer).

Результаты: концентрации антител в сыворотке измеряли через 24 ч, 48 ч и 4 дня после внутрибрюшинной инъекции 20 мг/кг антитела. Средние концентрации антител в сыворотке были сопоставимыми через 24 ч для всех исследованных антител. Для BAMB31_2a и антитела изотипического контроля снижение концентрации антитела происходило постепенно с течением времени (примерно до 30% снижения на 4 день), в то время как для mE8c можно было наблюдать явно более сильное снижение с течением времени со снижением примерно на 97% на 4 день (фиг. 7).

В заключение было показано различие в фармакокинетических профилях после в/б инъекции BAMB31_2a и mE8c в мышинной модели с отложением бляшек, что указывает на более медленный клиренс после лечения антителом BAMB31_2a по сравнению с mE8c.

Пример 9: исследования эффективности длительного лечения на трансгенных мышинных моделях.

Эффективность снижения амилоидной нагрузки, а также влияние на микрогеморрагию после длительного лечения BAMB31_2a mIgG2a исследовали на модели трансгенных мышей.

Материалы и способы: трансгенным мышам PDAPP (V717F) (средний возраст 18,3 месяца в начале исследования) вводили еженедельно в/б дозы антител BAMB31_2a (mIgG2a) в дозе 30 мг/кг в течение 12 недель. В эксперимент включали контрольную группу, получающую инъекцию антитела изотипического контроля mIgG2a. Животных умерщвляли на 7-й день после конечной в/б инъекции (средний возраст 21,1 месяца в конце исследования). Мышам проводили перфузию PBS перед сбором тканей. Левое полушарие (фракция 1: гиппокамп, фракция 2: остальной мозг без гиппокампа/мозжечка/ствола мозга) подвергали криоконсервации для дальнейшего биохимического анализа, в то время как правое полушарие фиксировали в течение ночи в фиксаторе на основе формалина с последующей заливкой парафином и получением срезов (5 мкм) с помощью микротомы.

Для оценки влияния на амилоидную нагрузку после длительного лечения проводили как биохимический, так и иммуногистохимический анализ. Для биохимического анализа мозга гомогенизировали в ледяном 5М гуанидин-HCl и 50 мМ буфера для экстракции трис/HCl (100 мг ткани/мл буфера для экстракции) с использованием пробирок Lysing Matrix Tallprep D (MP Bio). После гомогенизации образцы помещали во вращающееся устройство с функцией переворачивания на 3 ч при комнатной температуре. Перед проведением иммунологических анализов MSD полученные гомогенаты хранили при -80°C.

Стандарты из синтетического пептида A β растворяли в диметилсульфоксиде (DMCO) (Sigma) в концентрации 0,1 мг/мл и хранили при -80°C. Для применения в иммунологических анализах MSD пептиды дополнительно разводили в 0,5М GuHCl+5 мМ трис-HCl - pH 8,0 (10-кратное разбавление буфера для экстракции в 0,1% казеине в PBS). Экстракты GuHCl размораживали и разбавляли 1:10 в ледяном растворе 0,1% казеина в PBS и центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин при 4°C. Супернатант восстанавливали для применения в анализах сэндвич-MSD с дальнейшими разведениями образцов в 0,5М GuHCl+5 мМ трис-HCl - pH 8,0 (10-кратное разбавление буфера для экстракции в 0,1% казеине в PBS).

Стандартные 96-луночные планшеты Sector (Meso Scale Discovery; г. Роквилл, штат Мэриленд) на ночь наносили моноклональные антитела в концентрации 1,5 мкг/мл в PBS при температуре 4°C. На следующий день планшеты промывали и блокировали 0,1% казеином в PBS в течение 2 ч при комнатной температуре. Стандарты и образцы инкубировали в течение ночи при 4°C с меченым биотином вторичным антителом. После инкубации в течение ночи планшеты промывали и инкубировали со вторичным реагентом для выявления (меченым SULFO-TAG™ стрептавидином) в течение 2 ч при

комнатной температуре. Планшеты промывали и добавляли 2х буфер для считывания Т, после чего планшеты считывали в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрации Аβ определяли с использованием стандартной кривой с четырехпараметрической логистической моделью с весовой функцией $1/Y^2$.

Комбинацию антител JRF/АβN/25+4G8-биотин использовали для исследования концентраций Аβ1-Х в гомогенатах головного мозга.

Для иммуногистохимического анализа после депарафинизации и повторной гидратации срезов проводили извлечение антигена посредством инкубации микропрепаратов в течение 10 мин в муравьиной кислоте (70% в дистиллированной воде) и блокировали активность эндогенной пероксидазы с помощью 3% пероксида водорода (DAKO, г. Глоструп, Дания, S2023). Срезы инкубировали в течение ночи с биотинилированным антителом 4G8 (Biolegend; г. Сан-Диего, штат Калифорния), разведенным 1/2000 в разбавителе антител с компонентами снижения фоновой окраски (DAKO, S3022). После интенсивной промывки на микропрепараты наносили стрептавидин-ПХ (PK6100 Elite, Vector labs) в течение 30 мин с последующим хромогенным мечением 3,3-диаминобензидином (DAB) (DAKO, K3468). Микропрепараты подвергали контрокрашиванию гематоксилином, дегидратировали и переводили в постоянный препарат путем заключения в Vectamount (H-5000, Vector Labs). Изображения (20х) получали с помощью сканера NanoZoomer для микропрепаратов (Hamamatsu Photonics) и анализировали с помощью Matlab/Phaedra. Представляющие интерес области (ПАО) определяли вручную в соответствии с ALAS Franklin and Paxinos (Franklin KB, Paxinos G. Mouse brain in stereotaxic coordinates. Waltham: Academic Press; 1997) и для каждой ПАО рассчитывали процентную долю площади, меченной DAB, от общей площади.

Для оценки влияния на микрогеморрагию выполняли окрашивание по Перлсу. Вкратце, залитые парафином срезы ткани обрабатывали кислым раствором ферроцианида в соответствии с протоколом, описанным ниже. Ион трехвалентного железа (Fe^{3+}), присутствующий в микрокровоизлияниях, соединяется с ферроцианидом, что приводит к образованию синего пигмента, называемого берлинской лазурью. После депарафинизации и повторной гидратации срезы инкубировали 30 мин в смеси 1/1 2% ферроцианида калия (Sigma-Aldrich) и 2% ледяной соляной кислоты (Sigma-Aldrich). После трехкратного промывки микропрепаратов в дистиллированной воде проводили контрокрашивание ядерным быстрым красным (Sigma-Aldrich) с последующим промыванием в дистиллированной воде, дегидратацией и заключением в монтирующую среду (Vectaarm, Vector Labs). Визуализацию проводили с помощью сканера для микропрепаратов NanoZoomer (Hamamatsu Photonics). Количество положительных по Перлсу клеток около мозговых оболочек подсчитывали вручную.

Результаты: в целом, наблюдали небольшое количество микрогеморрагий, наблюдаемых на исходном уровне, группах изотипического контроля и лечения BAMB31 (фиг. 8). Биохимический анализ показал снижение на 34% ($p < 0,0001$) для BAMB31_2a по сравнению с антителом изотипического контроля для концентраций Аβ1-х в гиппокампе (фиг. 9). Кроме того, иммуногистохимический анализ с антителом 4G8 показал снижение на 23% ($p < 0,0001$) и 37% ($p < 0,001$) по сравнению с антителом изотипического контроля для гиппокампа и коры, соответственно.

В заключение, эффективность снижения амилоидной нагрузки была продемонстрирована без увеличения частоты микрокровоизлияний после длительных внутрибрюшинных инъекций BAMB31 на мышинной модели с отложением бляшек, что указывает на благоприятное соотношение эффективности и токсичности после лечения антителом BAMB31.

Пример 10: фармакокинетика мкАт к HFA BAMB31.

Фармакокинетику мкАт к HFA BAMB31 как изотипа IgG1 дикого типа (BAMB674) и +YTE IgG1 (BAMB675) оценивали на яванских макаках для прямого сравнения свойств в периферическом кровообращении и в головном мозге.

Материалы и способы: в каждую группу вводили по три животных в дозе 25 мг/кг внутривенной (в/в) болюсной инъекции каждого мкАт и отбирали образцы сыворотки в течение 5-недельного периода. Трех дополнительным обезьянам вводили 25 мг/кг в/в болюсно каждого мкАт на 6-й неделе и отбирали ткань головного мозга в каждой группы на 7-й и 42-й день после введения. Всего образцы головного мозга собирали у трех яванских макаков на 7 и 42 сутки для каждой молекулы.

Анализ воздействия лекарственного средства для BAMB674 и BAMB675 из сыворотки крови яванских макаков *in vivo* и образцов ткани головного мозга были выполнены с использованием индивидуальных подходящих электрохемилюминесцентных иммуноанализов (ECLIA) с определением конечных точек на Sector Imager S600 от Meso Scale Discovery (MSD). Для каждого из соединений и матриц применяли один формат анализа, что приводило к получению четырех независимых способов измерения экспозиции. Формат описан ниже: соединения мкАт захватывали и обнаруживали с помощью мышинового мкАт, специфического к человеческому Fc (домен CH2). Для препарата ткани головного мозга получали гомогенат путем криопульверизации замороженной ткани и разбавления буферным раствором. Концентрацию белка в ткани проверяли и номинализовали с помощью анализа BCA с получением конечной концентрации белка, используемой в способе. Регрессию исходных данных

выполняли в программном обеспечении Watson LIMS с использованием логистической модели с 5 параметрами (автоматическая оценка) аппроксимации с взвешиванием стандартной кривой $1/Y^2$.

Двухкомпарментная (центральный (V_C) и тканевый (V_T) компартменты) фармакокинетическая (ФК) модель с внутривенным (в/в) введением (введ.) в центральный компартмент, межкомпарментным клиренсом (Q) и линейным клиренсом (CL) использовалась для определения ФК характеристик ВАМВ674 и ВАМВ675 у яванских макаков. На фиг. 10 представлена схема модели.

Результаты: вычисляли терминальный период полужизни для каждого антитела, как показано на фиг. 11, вместе с данными для яванских макаков и аппроксимацией 2-компарментной модели. Изотип +YTE IgG1 (ВАМВ675) показал ~1,6-кратное увеличение периода полужизни по сравнению с изотипом IgG1 дикого типа (ВАМВ674). Это связано с ~3 кратным повышением аффинности к FcRn изотипа +YTE (ВАМВ675) по сравнению с мкАт IgG1 дикого типа (ВАМВ674), приведенным в табл. 5.

Уровни лизата головного мозга в разных областях и между мкАт на 7-й день одинаковы, но только YTE мкАт неизменно обнаруживается в областях головного мозга и животных на 42-й день. Результаты показаны на фиг. 12. Это согласуется с увеличением экспозиции +YTE мкАт в более поздние моменты времени.

При описании настоящего изобретения и вариантов его осуществления для ясности используется конкретная терминология. Однако изобретение не ограничивается конкретной выбранной терминологией. Специалист в данной области техники признает, что могут быть использованы другие эквивалентные компоненты и другие способы, разработанные без отхода от общих понятий настоящего изобретения. Все ссылки, процитированные в любых местах настоящего описания, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы каждая из них включалась в настоящий документ индивидуально.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарную область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- a) SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно;
- b) SEQ ID NO: 1, 7, 3, 4, 5 и 6, соответственно;
- c) SEQ ID NO: 1, 7, 3, 8, 5 и 6, соответственно;
- d) SEQ ID NO: 1, 2, 3, 8, 5 и 6, соответственно;
- e) SEQ ID NO: 56, 57, 3, 8, 5 и 6, соответственно;
- f) SEQ ID NO: 56, 57, 3, 4, 5 и 6, соответственно;
- g) SEQ ID NO: 56, 58, 3, 4, 5 и 6, соответственно;
- h) SEQ ID NO: 56, 7, 3, 8, 5 и 6, соответственно;
- i) SEQ ID NO: 1, 57, 3, 8, 5 и 6, соответственно;
- j) SEQ ID NO: 56, 7, 3, 4, 5 и 6, соответственно;
- k) SEQ ID NO: 1, 57, 3, 4, 5 и 6, соответственно;
- l) SEQ ID NO: 1, 58, 3, 4, 5 и 6, соответственно; или
- m) SEQ ID NO: 56, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно;

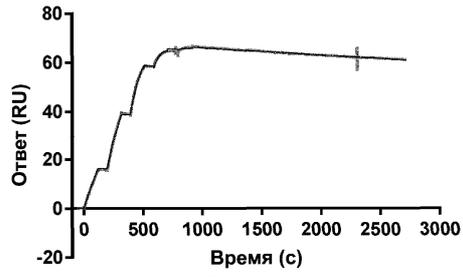
где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает 3pE Ab.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 20, или 21, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 10, 12, 14, 18, 22, 53, или 55.

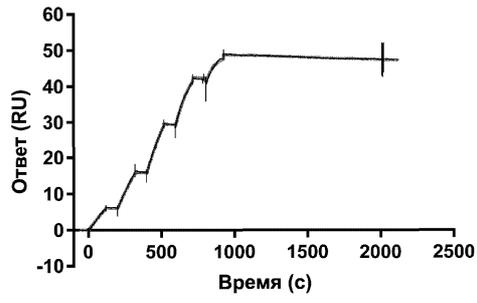
3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее:

- a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22;
- b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;
- c) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;
- d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- e) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- f) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

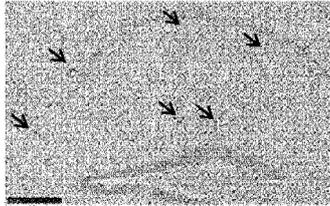
- g) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- h) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;
- i) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;
- j) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 53; или
- k) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 55.
4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.
5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.
6. Выделенное моноклональное антитело, содержащее:
- a) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 38;
- b) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 39, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 38;
- c) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 52; или
- d) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 39, и аминокислотную последовательность легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 54.
7. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6.
8. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.7.
9. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.8.
10. Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.
11. Способ лечения патологического состояния, связанного с образованием бляшек, содержащих бета-амилоидный белок, у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или фармацевтической композиции по п.10.
12. Способ по п.11, в котором патологическое состояние представляет собой болезнь Альцгеймера.
13. Способ по п.11, в котором патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из деменции, связанной с трисомией 21 (синдром Дауна), болезни диффузных телец Леви, миозита с включением, церебральной амилоидной ангиопатии и наследственной церебральной геморрагии с амилоидозом голландского типа (HCHWA-D -англ.: hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch-type).
14. Способ уменьшения бляшек, связанных с болезнью Альцгеймера, у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или фармацевтической композиции по п.10.
15. Способ предотвращения активности нуклеации бляшек 3pE A β у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или фармацевтической композиции по п.10.
16. Способ получения моноклонального антитела по любому из пп.1-6 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5, включающий культивирование клетки по п.9, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.
17. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, при этом способ включает комбинирование моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.
18. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связывает 3pE A β .



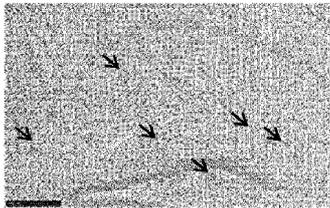
Фиг. 1



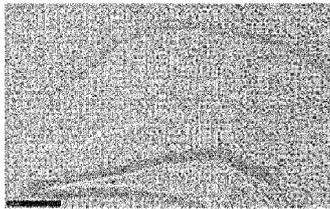
Фиг. 2



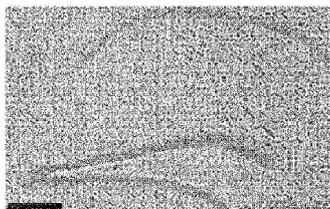
Фиг. 3А



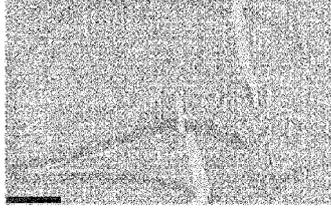
Фиг. 3В



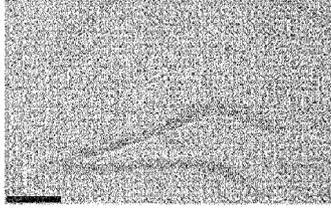
Фиг. 3С



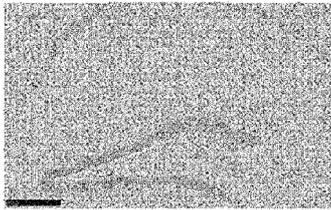
Фиг. 3D



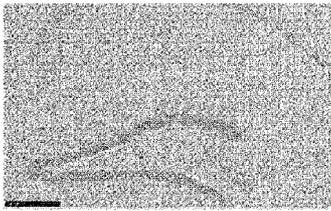
Фиг. 3Е



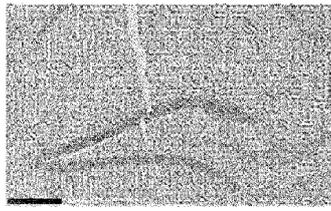
Фиг. 3F



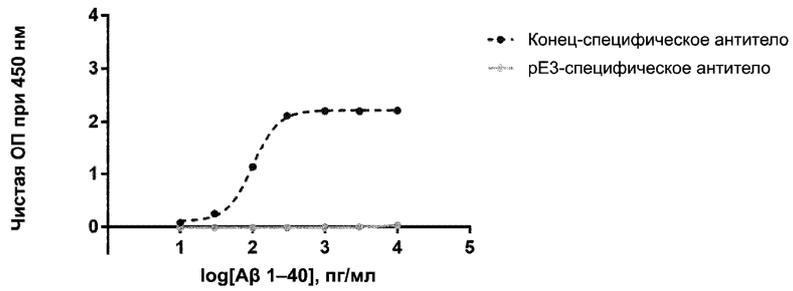
Фиг. 3G



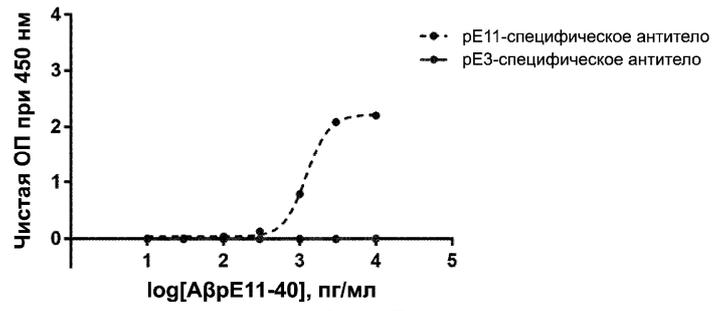
Фиг. 3H



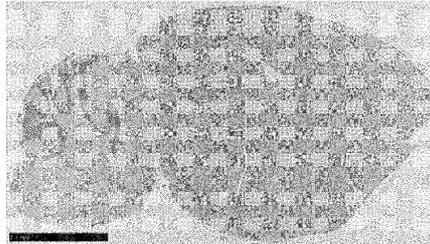
Фиг. 3I



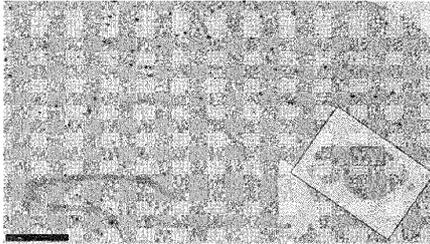
Фиг. 4А



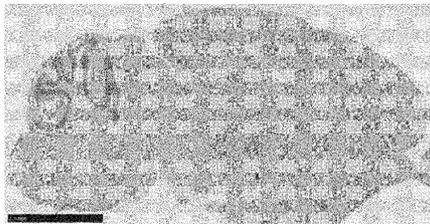
Фиг. 4В



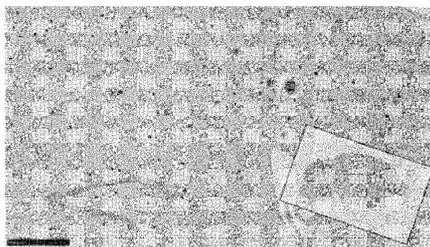
Фиг. 5А



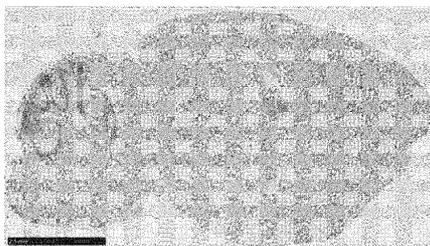
Фиг. 5В



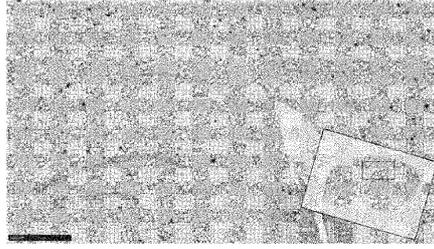
Фиг. 5С



Фиг. 5D



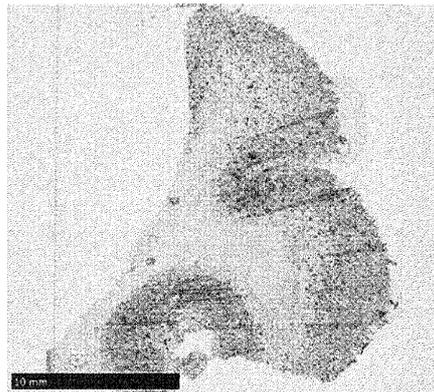
Фиг. 5Е



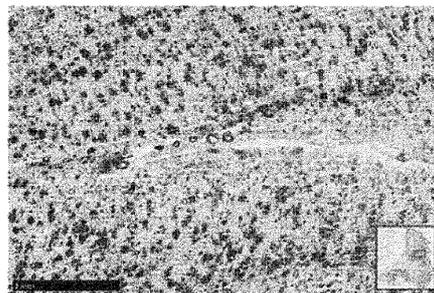
Фиг. 5F



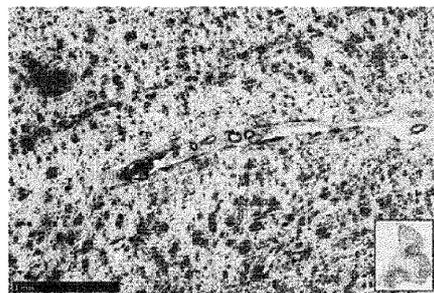
Фиг. 6A



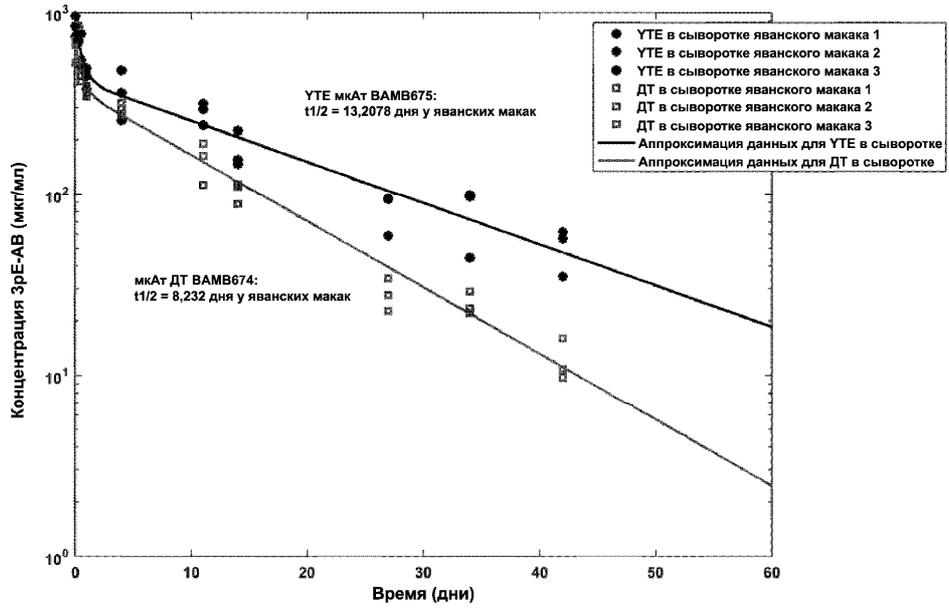
Фиг. 6B



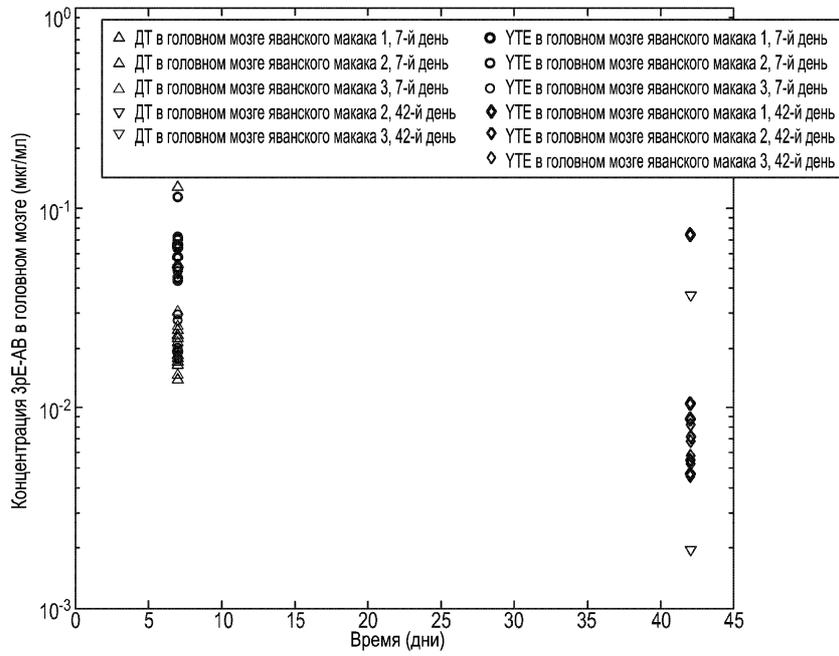
Фиг. 6C



Фиг. 6D



Фиг. 11



Фиг. 12

