

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201591285** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2016.02.29

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.03.12

(54) **ИММУНОТЕРАПИЯ ТАУ**

(31) 61/780,624; 61/800,382

(32) 2013.03.13; 2013.03.15

(33) US

(86) PCT/US2014/025044

(87) WO 2014/165271 2014.10.09

(88) 2014.12.24

(71) Заявитель:

**ПРОТЕНА БИОСАЙЕНСЕС
ЛИМИТЕД (IE)**

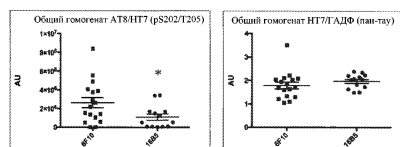
(72) Изобретатель:

**Сьюберт Питер, Долан Ш Филип
Джеймс, Лью Юэ, Барбур Робин (US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены антитела к тау. Указанные антитела ингибируют или задерживают развитие тау-ассоциированных патологий и ассоциированного симптоматического ухудшения.



201591285

A1

A1

201591285

ИММУНОТЕРАПИЯ ТАУ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 [0001] Настоящая заявка представляет собой не являющуюся предварительной заявкой, поданную на основе 61/780624, поданной 13 марта 2013 года, и 61/800382, поданной 15 марта 2013 года, каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте для любых целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 [0002] Тау представляет собой хорошо известный человеческий белок, который может существовать в фосфорилированных формах (см., например, Goedert, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:4051-4055(1988); Goedert, EMBO J. 8:393-399(1989); Lee, Neuron 2:1615-1624(1989); Goedert, Neuron 3:519-526(1989); Andreadis, Biochemistry 31:10626-10633(1992)). Известно, что тау играет роль в стабилизации микротрубочек, в частности, в центральной нервной системе. Общий тау (t-тау, т.е. фосфорилированные и нефосфорилированные формы) и фосфо-тау (p-тау, т.е. фосфорилированный тау) высвобождаются мозгом в ответ на повреждение нейронов и нейродегенерацию, и, как сообщалось, уровень данных белков повышен в спинномозговой жидкости (СМЖ) пациентов с болезнью Альцгеймера по сравнению с общей популяцией (Jack et al., Lancet Neurol 9: 119–28 (2010)).

20 [0003] Тау представляет собой основной компонент нейрофибриллярных клубков, которые наряду с бляшками являются отличительной особенностью болезни Альцгеймера. Клубки состоят из аномальных фибрилл размером 10 нм в диаметре, которые спарены в виде спирали с регулярной периодичностью 80 нм. Тау в нейрофибриллярных клубках аномально фосфорилирован (гиперфосфорилирован) фосфатными группами, присоединенными к специфическим сайтам в молекуле. Тяжелое поражение нейрофибриллярными клубками обнаруживается во II слое нейроинальной области коры, CA1 и в области основания гиппокампа, миндалинах и более глубоких слоях (III, V слоях и поверхностном VI слое) неокортекса при болезни Альцгеймера. Гиперфосфорилированный тау, как сообщалось, также препятствует сборке микротрубочек, что может способствовать нарушению нейронной сети.

[0004] Включения тау отчасти обуславливают нейропатологию нескольких нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, лобно-височную лобарную дегенерацию, прогрессирующий надъядерный паралич и Болезнь Пика.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 [0005] В настоящем изобретении предложены моноклональные антитела, которые конкурируют с моноклональными антителами 16B5 за связывание с тау. Некоторые антитела представляют собой гуманизированные, химерные, венированные антитела или антитела человека. Некоторые антитела представляют собой изотип IgG человека (*например*, IgG1, IgG2, или IgG4). Подобные антитела имеют константную область IgG1 человека, имеющую
10 последовательность SEQ ID №: 29. Некоторые антитела имеют каппа-константную область человека, имеющую последовательность SEQ ID №: 32. Некоторые антитела имеют по меньшей мере одну мутацию в константной области.

[0006] Некоторые из антител представляют собой гуманизированную, химерную или венированную форму моноклонального антитела 16B5. Некоторые антитела имеют три CDR
15 легкой цепи, как определено по Кабату, и три CDR тяжелой цепи, как определено по Кабату, моноклонального антитела 16B5. Некоторые антитела связываются с тау в фосфорилированной и нефосфорилированной форме.

[0007] В настоящем изобретении также предложены моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ
20 ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8). Подобные антител представляют собой антитела человека, гуманизированные, химерные или венированные антитела. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 25-44 последовательности SEQ ID №:1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 30-
25 39 последовательности SEQ ID №:1. Некоторые антитела связываются с тау в фосфорилированной и нефосфорилированной форме.

[0008] В настоящем изобретении также предложены моноклональные антитела, содержащие зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 95%, по
30 меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%) идентичную последовательности SEQ ID №:15, и зрелую вариабельную область легкой цепи по меньшей мере на 90% (*например*, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%) идентичную

последовательности SEQ ID №:22. В определенных вариантах реализации моноклональное антитело содержит три CDR по Кабату последовательности SEQ ID №:15 и три CDR по Кабату последовательности SEQ ID №:22. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID №:15, и зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID №:21, 22 или 23.

[0009] В некоторых антителах по меньшей мере одна из позиций H13, H48 и H91 занята К, М и F, соответственно, и по меньшей мере одна из позиций L1, L4, L36 и L43 занята N, L, F и S, соответственно. В некоторых антителах позиции H13, H48 и H91 заняты К, М и F, соответственно, и по меньшей мере две из позиций L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно. В некоторых антителах позиции H13, H48 и H91 заняты К, М и F, соответственно, и по меньшей мере три из позиций L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно. В некоторых антителах позиции H13, H48 и H91 заняты К, М и F, соответственно, и позиции L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно.

[0010] В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, и зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи. В некоторых антителах константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области человека, которая имеет пониженное связывание с рецептором Fc γ по сравнению с природной константной областью человека. В некоторых антителах константная область тяжелой цепи представляет собой изотип IgG1.

[0011] В некоторых антителах различия в CDR зрелой переменной области тяжелой цепи и зрелой переменной области легкой цепи из SEQ ID №: 15 и 22, соответственно, находятся в позициях H60-H65.

[0012] Антитела могут представлять собой интактные антитела или фрагменты, такие как Fab-фрагмент.

[0013] Любое из моноклональных антител или фрагментов может быть конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

[0014] В настоящем изобретении также предложены способы гуманизации антитела. Некоторые способы включают определение последовательности переменных областей

тяжелой и легкой цепи антитела мыши; синтезирование нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине с
5 получением гуманизированного антитела, где антитело мыши представляет собой 16B5.

[0015] В настоящем изобретении также предложены способы получения гуманизированного, химерного или венерованного антитела. Некоторые способы включают культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела, таким образом, что клетка секретирует антитело; и очистку
10 антитела от культуральной среды, где антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венерованную форму 16B5.

[0016] В настоящем изобретении также предложены способы получения клеточной линии, продуцирующей гуманизированное, химерное или венерованное антитело. Некоторые способы включают введение в клетки вектора, кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела
15 и селективный маркер; размножение клеток в условиях для отбора клеток, имеющих увеличенное число копий вектора; выделение отдельных клеток из выбранных клеток; и формирование банка клеток, клонированных из одной клетки, выбранной на основании выхода антител; где антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венерованную форму 16B5.

[0017] В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие любое антитело, описанное в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый
20 носитель.

[0018] В настоящем изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, содержащие сегмент, кодирующий переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность
25 SEQ ID №: 10.

[0019] В настоящем изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, содержащие сегмент, кодирующий переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность
30 SEQ ID №: 15. В некоторых нуклеиновых кислотах сегмент имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 25. Некоторые нуклеиновые кислоты дополнительно содержат сегмент, кодирующий константную область IgG1, необязательно константную область IgG1 человека, например, имеющую последовательность SEQ ID №: 29 при условии,

что С-концевой лизин может быть опущен. В некоторых нуклеиновых кислотах сегмент, кодирующий константную область IgG1, имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 30. Подобные нуклеиновые кислоты дополнительно содержат интрон, связывающий сегменты, кодирующие переменную область тяжелой цепи и константную область IgG1.

5 Например, интрон может иметь последовательность интрона, найденного в SEQ ID №: 31. Таким образом, интрон и сегмент, кодирующий константную область IgG1, могут иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 31.

[0020] В настоящем изобретении также предложена нуклеиновая кислота, содержащая сегмент, кодирующий переменную область легкой цепи, имеющий последовательность
10 SEQ ID №: 16.

[0021] В настоящем изобретении также предложена нуклеиновая кислота, содержащая сегмент, кодирующий переменную область легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID №: 21, 22 или 23. В некоторых нуклеиновых кислотах сегмент, кодирующий переменную область легкой цепи, имеет последовательность SEQ ID №: 26, 27 или 28.
15 Подобные нуклеиновые кислоты дополнительно содержат сегмент, кодирующий каппа-константную область. Каппа-константная область может представлять собой каппа-константную область человека и может иметь последовательность SEQ ID №: 32. Необязательно, нуклеиновая кислота, кодирующая каппа-константную область, имеет последовательность SEQ ID №: 33. Некоторые указанные нуклеиновые кислоты
20 дополнительно содержат интрон, связывающий сегмент, кодирующий переменную область легкой цепи, с сегментом, кодирующим каппа-константную область. Например, интрон может иметь последовательность интрона, найденного в SEQ ID №: 34. Таким образом, интрон и сегмент, кодирующий каппа-константную область, может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 34.

25 **[0022]** Любое из вышеупомянутых антител может включать тяжелую цепь, содержащую константную область IgG1 человека, имеющую последовательность SEQ ID №: 29, и/или легкую цепь, содержащую каппа-константную область человека, имеющую последовательность SEQ ID №: 32.

[0023] В настоящем изобретении также предложен выделенный фрагмент тау, содержащий
30 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8). Некоторые фрагменты включают 3-10 смежных остатков тау в

пределах остатков 30-39 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8). Некоторые фрагменты содержат остатки 33-37 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8). Некоторые фрагменты связаны с молекулой-носителем, необязательно через спейсер, который способствует выработке антител к фрагменту. Некоторые фрагменты являются частью фармацевтической композиции, содержащей адъювант, приемлемый для введения людям.

[0024] В настоящем изобретении также предложены способы лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера. Некоторые способы включают введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует такое антитело, пациенту, имеющему или с риском болезни Альцгеймера, и тем самым осуществляя лечение или профилактику заболевания. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке. В некоторых способах агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №: 1. В некоторых способах пациент является носителем ApoE4.

[0025] В настоящем изобретении также предложены способы лечения или осуществления профилактики заболевания, ассоциированного с тау. Некоторые способы включают введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует такое антитело, пациенту, имеющему или с риском заболевания, и тем самым осуществляя лечение или профилактику заболевания. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке (*например*, гуманизированное антитело 16B5). В некоторых способах агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1. В некоторых способах заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

[0026] В настоящем изобретении также предложены способы уменьшения аберрантного переноса тау. Некоторые способы включают введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует

такое антитело, пациенту, имеющему или с риском заболевания, ассоциированного с абберрантным переносом тау, и тем самым осуществляя лечение или профилактику заболевания. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке (*например*, гуманизированное антитело 16B5). В некоторых способах агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №: 1.

[0027] В настоящем изобретении также предложены способы индукции фагоцитоза тау. Некоторые способы включают введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует такое антитело, пациенту, имеющему или с риском заболевания, ассоциированного с накоплением тау. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке (*например*, гуманизированное антитело 16B5). В некоторых способах агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №: 1. В некоторых способах заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

[0028] В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования агрегации или отложения тау. В определенных вариантах реализации способы включают введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует такое антитело, пациенту, имеющему или с риском заболевания, ассоциированного с агрегацией или отложением тау. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке (*например*, гуманизированное антитело 16B5). В некоторых способах агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №: 1. В некоторых способах заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

[0029] В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования образования тау клубков. Некоторые способы включают введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует

такое антитело, пациенту, имеющему или с риском заболевания, ассоциированного с образованием клубков тау. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке (*например*, гуманизированное антитело 16B5). В некоторых способах агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который
5 содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №: 1. В некоторых способах заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

[0030] В настоящем изобретении также предложены способы скрининга агента в отношении активности против болезни Альцгеймера. Некоторые способы включают введение агента трансгенному животному, экспрессирующему трансгенный тау, и
10 определение того, ингибирует ли агент или задерживает по меньшей мере один признак или симптом болезни Альцгеймера, где агент представляет собой антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агент, который индуцирует такое антитело.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

15 [0031] **На фигуре 1** представлены результаты экспериментов по картированию эпитопа(ов), связывающихся с моноклональным антителом 16B5. Вестерн-блоты, содержащие полноразмерный тау или делеционные мутанты тау (Δ 5-24 или Δ 25-44), окрашены при помощи антител 16B5 (левое изображение) или антител Tau46 (правое изображение). Антитело Tau46 связывается с С-концевым эпитопом тау.

20 [0032] **На фигуре 2** представлены результаты экспериментов по картированию эпитопа(ов), связывающихся с моноклональным антителом 16B5. Вестерн-блоты, содержащие полноразмерный тау или делеционные мутанты тау, окрашены при помощи антител 16B5 (верхнее левое изображение) или антител Tau46 (правое изображение). Больше воздействие на блот, окрашенный антителами 16B5, показано на нижнем левом изображении.
25 Делеционные мутанты тау, проанализированные в данном эксперименте, включают Δ 25-44, Δ 5-24, Δ 23-32, Δ 30-39 и Δ 37-46.

[0033] **На фигуре 3** представлены результаты экспериментов аланинового сканирования по картированию эпитопа(ов), связывающихся с моноклональным антителом 16B5. Вестерн-блоты, содержащие дикий тип тау (WT) или аланиновые точечные мутанты тау, окрашены
30 при помощи антител 16B5 (левое изображение) или антител Tau46 (правое изображение).

Аланиновые мутанты тау, проанализированные в данном эксперименте, включают Т30А, М31А, Н32А, Q33А, D34А, Q35А, Е36А, G37А, D38А, Т39А, D40А, А41L и G42А.

5 [0034] На фигуре 4 показаны относительные количества белка тау, обнаруженные в нерастворимой в саркозиле фракции ствола головного мозга трансгенных мышей, которые экспрессируют белок tau.P301L человека. Мышей пассивно иммунизировали или антителом 16B5 или антителом 6F10, неиммунным изотипом IgG1 в качестве контроля. Образцы анализировали при помощи вестерн-блоттинга, окрашивания антителами и количественной оценки результирующего сигнала. Антитела, применяемые для детектирования, включали специфические антитела к фосфо-тау (АТ8, верхнее левое изображение; АТ100, нижнее левое изображение, или 1F5, верхнее правое изображение) и пан тау антитела (НТ7, нижнее правое изображение).

15 [0035] На фигуре 5 показано соотношение количества фосфо-тау и общего белка тау (левое изображение) и нормированное количество общего тау (правое изображение), обнаруженное в общих гомогенатах ствола головного мозга трансгенных мышей, которые экспрессируют белок tau.P301L человека. Мышей пассивно иммунизировали или антителом 16B5 или антителом 6F10, неиммунным изотипом IgG1 в качестве контроля. Образцы анализировали при помощи вестерн-блоттинга, окрашивания антителами и количественной оценки результирующего сигнала. Антитела АТ8 применяли для обнаружения фосфо-тау, и антитела НТ7 применяли для обнаружения общего тау. Антитела к ГАФД применяли для нормализации количества тау, обнаруженного у мышей, обработанных посредством антител 16B5, по сравнению с контрольным антителом 6F10.

25 [0036] На фигуре 6 представлены срезы ядер мозжечка трансгенных мышей, которые экспрессируют белок tau.P301L человека, иммуногистохимически окрашенные с помощью антител АТ8 к фосфо-тау. Мышей пассивно иммунизировали или антителом 16B5 (верхнее левое изображение) или антителом 6F10 (нижнее левое изображение), неиммунным изотипом IgG1 в качестве контроля. Оценка количества окрашенного тау, обнаруженного посредством антитела АТ8 в промежуточном ядре мозжечка, передней и задней части, прилегающей к боковому ядру мозжечка (IntA/P/LAT) и субталамическом ядре, прилегающем к неопределенной зоне (STH/ZI) у мышей, пассивно иммунизированных антителами 16B5 или 6F10, показана на верхних столбчатых диаграммах. Оценка количества окрашенного фосфо-тау, обнаруженного с применением антитела АТ100 к фосфо-тау на

срезах IntA/P/LAT и STN/ZI, полученных от мышей, пассивно иммунизированных антителами 16B5 или 6F10, показана на нижних столбчатых диаграммах. Статистическую значимость оценивали при помощи t-теста Стьюдента, $p < 0,05$.

5 [0037] На **фигуре 7** представлены результаты иммунопреципитации тау, полученные при помощи химерных антител 16B5 и гуманизированных антител 16B5 (версии H1L2 и H1L3). Иммунопреципитация тау происходила и в растворимых, и в нерастворимых фракциях посмертных образцов лобной коры, полученных от пациента с болезнью Альцгеймера. Присутствие тау в блоттированных иммунопреципитатах определяли при помощи поликлональных антител к тау (тау pAb).

10

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0038] Моноклональные антитела и другие терапевтические агенты обычно представлены в выделенном виде. Это означает, что агент обычно по меньшей мере на 50% масс./масс. чистый от мешающих белков и загрязняющих веществ, образующихся при производстве или очистке, но это не исключает возможности того, что агент объединен с избытком
15 фармацевтически приемлемого носителя(ей) или другими носителями, предназначенными для облегчения его применения. Иногда моноклональные антитела (или другие терапевтические агенты) по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% w/w масс./масс. чистые от мешающих белков и загрязняющих веществ, образующихся при производстве или очистке.

20 [0039] Антитела согласно изобретению обычно связываются с предназначенной мишенью с константой ассоциации по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или 10^{10} M^{-1} . Такое связывание является специфическим связыванием в том плане, что заметно выше по величине и отличается от неспецифического связывания, происходящего с по меньшей мере одной
25 посторонней мишенью. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между конкретными функциональными группами или конкретным пространственным соответствием (*например*, по типу "ключа и замка"), тогда как неспецифическое связывание обычно происходит за счет силы Ван-дер-Ваальса. Специфическое связывание, однако, не обязательно означает, что моноклональное антитело связывается с одной и только одной мишенью.

30 [0040] Основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая

пара содержит одну "легкую" (примерно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (примерно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область примерно от 100 до 110 или более аминокислот, которая несет основную ответственность за распознавание антигена. Данная вариабельная область первоначально экспрессируется связанной с расщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельную область без сигнального пептида иногда называют зрелой вариабельной областью. Таким образом, например, зрелая вариабельная область легкой цепи, означает вариабельную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбокси-концевой участок каждой цепи определяет константную область, которая несет основную ответственность за эффекторную функцию. Константная область может включать в себя любые или все из области CH1, шарнирной области, области CH2 и области CH3.

[0041] Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. В легких и тяжелых цепях вариабельные и константные области соединены "J" областью примерно 12 или более аминокислот, тяжелые цепи также содержат "D" область примерно 10 или более аминокислот. (См. в общем, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7) (включена посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей).

[0042] Зрелые вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют сайт связывания антитела. Таким образом, интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифичных антител, два сайта связывания являются одинаковыми. Цепи в целом имеют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми областями, определяющими комплементарность, или CDR. CDR от двух цепей каждой пары выровнены каркасными областями, обладающими способностью связываться со специфическим эпитопом. От N-конца к C-концу и легкие и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Аминокислоты к каждому домену относят в соответствии с определениями по Кабату, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989). Кабат также предлагает широко применяемую систему нумерации (нумерация Кабата), в которой

соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями назначается тот же номер.

[0043] Термин "антитело" включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Обычно фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены, за специфическое связывания с мишенью. Фрагменты включают отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, Fv и однодоменные антитела. Однодоменные (вариабельные) антитела включают области VH, отделенные от своих партнеров VL (или наоборот) в обычных антителах (Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546), так же как и области VH (иногда называемые VHH) у таких видов, как *Camelidae* или хрящевых рыб (например, акула-нянька), у которых области VH не связаны с областями VL (см., например, WO 9404678). Однодоменные антитела, в которых одна цепь отделена от ее природных, партнеров иногда называют Dab, и однодоменные антитела от *Caemelidae* или хрящевых рыб иногда называют нанотела. Константные области или части константных областей могут присутствовать или могут не присутствовать в однодоменных антителах. Например, природные вариабельные области однодоменного антитела от *Camelidae* включают вариабельную область VHH, и константные области CH2 и CH3. Однодоменные антитела можно подвергать гуманизации аналогичными подходами как для обычных антител. Антитела типа Dab, как правило, получают из антител человеческого происхождения. Антитела типа нанотел являются *Camelidae* или акульего происхождения и могут подвергаться гуманизации. Фрагменты моно получить при помощи технологии рекомбинантных ДНК или путем ферментативного или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин "антитело" также включает в себя биспецифические антитела. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две различные пары тяжелых/легких цепей и два различных сайта связывания (см., например, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)).

[0044] Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть сформирован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, которые расположены рядом благодаря третичной укладке одного или более белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные благодаря третичной укладке, обычно разрушаются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп

обычно включает по меньшей мере 3, и чаще всего по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Когда эпитоп указан в пределах диапазона аминокислотных остатков в белке (*например*, в пределах от 25 до 44 остатков тау), диапазон включает остатки, определяющие его границы. Определенные остатки в пределах диапазона участвуют в образовании эпитопа, тогда как другие могут не участвовать. Остатки, которые образуют эпитоп, могут быть или могут не быть смежными друг с другом. Аналогичным образом, когда антитело связывается с эпитопом, находящимся в пределах конкретного диапазона аминокислот, антитело не обязательно должно связываться со всеми остатками аминокислот в пределах диапазона, и остатки эпитопа, которые контактируют с антителом, могут быть или могут не быть смежными друг с другом. Методы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См., *например*, Epitope Mapping Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

[0045] Антитела, которые распознают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы, можно идентифицировать при простом иммуноанализе, показывающем способность одного антитела конкурировать с другим антителом за связывание с антигеном-мишенью. Эпитоп антитела также можно определить при помощи рентгеновской кристаллографии антитела, связанного с антигеном, чтобы идентифицировать контактирующие остатки. Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Изобретение включает антитела, которые конкурируют с 16B5 и/или которые связываются с тем же эпитопом на тау, как и 16B5.

[0046] Конкуренцию между антителами определяют при помощи анализа, в котором тестируемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела (*например*, 16B5) к общему антигену (см., *например*, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток тестируемого антитела (*например*, по меньшей мере 2x, 5x, 10x, 20x или 100x) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 50%, но предпочтительно 75%, 90% или 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. Антитела, определенные в конкурентном анализе (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем

же эпитопом, что и эталонные антитела, и антитела, связывающиеся с прилегающим эпитопом достаточно близким к эпитопу, связывающимся с эталонным антителом, чтобы происходили стерические помехи.

5 [0047] Термин "пациент" включает людей и других млекопитающих, которые получают профилактическое или терапевтическое лечение.

10 [0048] Для классификации аминокислотных замен как консервативных или неконсервативных, аминокислоты сгруппированы следующим образом: Группа I (гидрофобные боковые цепи): метионин, аланин, валин, лейцин, изолейцин; Группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): цистеин, серин, треонин; Группа III (кислые боковые цепи): аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; Группа IV (основные боковые цепи): аспарагин, глутамин, гистидин, лизин, аргинин; Группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): глицин, пролин; и Группа VI (ароматические боковые цепи): триптофан, тирозин, фенилаланин. Консервативные замены включают замены между аминокислотами в том же классе. Неконсервативные замены представляют собой замену члена одного из этих классов на другой член.

20 [0049] Процент идентичности последовательностей определяется с последовательностями антител максимально выровненными по системе нумерации Кабата. После выравнивания, если область исследуемого антитела (*например*, вся зрелая вариабельная область тяжелой или легкой цепи) сравнивается с такой же областью эталонного антитела, процент идентичности последовательности между областями исследуемого и эталонного антитела представляет собой количество позиций, занимаемых одинаковыми аминокислотами, в обеих областях исследуемого и эталонного антитела, разделенное на общее число выровненных позиций двух областей, без учета пробелов, умноженное на 100 для преобразования в проценты.

25 [0050] Термин "адьювант" относится к соединению, которое при введении в сочетании с антигеном усиливает и/или перенаправляет иммунный ответ на антиген, но при введении отдельно, не генерирует иммунный ответ на антиген. Адьюванты могут усиливать иммунный ответ по нескольким механизмам, включая рекрутинг лимфоцитов, стимуляцию В и/или Т-клеток, и стимуляцию макрофагов.

30 [0051] Заболевание ассоциировано с тау, если совокупность пациентов с заболеванием имеет повышенный уровень тау в мозге, или повышенные отложения или включения тау, или наличие клубков тау в мозге, или повышенное фосфорилирование тау в мозге (среднее

количество фосфатных групп в молекуле тау), или аномальную межклеточную или внутриклеточную передачу тау по сравнению с совокупностью субъектов, для которой не известно наличие неврологического заболевания. Заболевание также ассоциировано с тау, если пациенты с вариантной формой гена тау имеют повышенный риск развития заболевания по сравнению с пациентами с диким типом (наиболее часто встречающийся вариант в популяции человека) гена тау.

[0052] Индивид находится в группе повышенного риска заболевания, если субъект имеет по меньшей мере один известный фактор риска (*например*, генетический, биохимический, семейный анамнез, ситуационное воздействие), помещая лиц с данными фактором риска в статистически значимый больший риск развития заболевания, чем лиц без факторов риска.

[0053] Термин "симптом" относится к субъективному свидетельству о заболевании, например, к измененной походке, по ощущениям пациента. "Признак" относится к объективному свидетельству о заболевании, наблюдаемым врачом.

[0054] Статистическая значимость $p \leq 0,05$.

15 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Общее

[0055] В изобретении предложены антитела, которые связываются с тау. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 23-46 последовательности SEQ ID №.1. Некоторые антитела связываются с тау независимо от состояния фосфорилирования. Некоторые антитела согласно изобретению служат для ингибирования или задержки тау-ассоциированных патологий и связанного с ними симптоматического ухудшения. Хотя понимание механизма не требуется для практической реализации изобретения, снижение токсичности может происходить в результате индукции антителами фагоцитоза тау, ингибирования меж- или внутримолекулярной агрегации тау или от связывания с другими молекулами, путем стабилизации нетоксичной конформации, или путем ингибирования межклеточного или внутриклеточного переноса патогенных форм тау среди прочих механизмов. Антитела согласно изобретению или агенты, которые индуцируют такие антитела, можно применять в способах лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера и других заболеваний, ассоциированных с тау.

30 II. Тау

[0056] Если иное не очевидно из контекста, указание на тау означает природную форму тау человека, включая все изоформы независимо от наличия посттрансляционной модификации (*например*, фосфорилирования, гликирования или ацетилирования). Существует шесть основных изоформ (вариантов сплайсинга) тау, встречающихся в мозге человека. Самый длинный из этих вариантов имеет 441 аминокислоту, от которых отщепляется начальный остаток метионина. Остатки пронумерованы в соответствии с изоформой 441. Таким образом, например, указание на фосфорилирование в позиции 404 означает позицию 404 изоформы 441, или соответствующую позицию любой другой изоформы, при максимальном вырывании с изоформой 441. Аминокислотные последовательности этих изоформ и номера Swiss-Prot представлены ниже.

P10636-8 (SEQ ID №:1)

	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
15	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG	TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG
	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
	HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK
	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
20	TPPSSGEPFK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSR	RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
	SRLQTAPVPM	PDLKNVSKSI	GSTENLKHQP	GGGKVQIINK	KLDLSNVQSK	CGSKDNIKHV
	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
	PGGGSVQIVY	KPVDLSKVT	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDLDFKDRV	QSKIGSLDNI
	<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
25	THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN	VSSTGSIDMV
	<u>430</u>	<u>440</u>				
	DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L			

P10636-7 (SEQ ID №:2)

30	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
	SETSDAKSTP	TAEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMVS	KSKDGTGSD	KKAKGADGKT
	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
35	KIATPRGAAP	PGQKGQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
	SRTPSLPTP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVSK	IGSTENLKHQ
	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
40	PGGGKVQIIN	KKLDLSNVQS	KCGSKDNIKH	VPGGGSVQIV	YKPVDLSKVT	SKCGSLGNIH
	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
	HKPGGGQVEV	KSEKLDLDFKDR	VQSKIGSLDN	ITHVPGGGNK	KIETHKLTFR	ENAKAKTDHG
	<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
	AEIVYKSPVV	SGDTSPRHLS	NVSSTGSIDM	VDSPQLATLA	DEVSASLAKQ	GL

P10636-6 (SEQ ID №:3)

45	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEEAGI	GDTPSLEDEA
	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>

AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA
 130 140 150 160 170 180
 PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS
 190 200 210 220 230 240
 5 AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ SKCGSKDNIK
 250 260 270 280 290 300
 HVPGGGSVQI VYKPVDSLKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLDKFD RVQSKIGSLD
 310 320 330 340 350 360
 10 NITHVPGGGN KKIETHKLTF RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSRPHL SNVSTGSID
 370 380
 MVDSPQLATL ADEVSASLAK QGL

P10636-5 (SEQ ID №:4)

10 20 30 40 50 60
 15 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 70 80 90 100 110 120
 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAEAGIGD TPSLEDEAAG
 130 140 150 160 170 180
 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
 190 200 210 220 230 240
 20 TPPSSGEPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR SRTPSLPTPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
 250 260 270 280 290 300
 SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK CGSLGNIHHK
 310 320 330 340 350 360
 PGGGQVEVKS EKLDKDFKRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFREN AKAKTDHGAE
 25 370 380 390 400 410
 IVYKSPVVS GDTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID №:5)

10 20 30 40 50 60
 30 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 70 80 90 100 110 120
 SETSDAKSTP TAEAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSD KAKGADGKT
 130 140 150 160 170 180
 KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
 190 200 210 220 230 240
 35 SRTPSLPTP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKS IGSTENLKHQ
 250 260 270 280 290 300
 PGGGKVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDFRV QSKIGSLDNI
 310 320 330 340 350 360
 THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
 40 370 380
 DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

P10636-2 (SEQ ID №:6)

10 20 30 40 50 60
 45 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAGI GDTPSLEDEA
 70 80 90 100 110 120
 AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA
 130 140 150 160 170 180
 50 PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS

```

190      200      210      220      230      240
AKSRLQTAPV PMPDLKKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVVQIV YKPVDSLKVT SKCGSLGNIH

250      260      270      280      290      300
5 HKPGGGQVEV KSEKLDLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG

310      320      330      340      350
AEIVYKSPVV SGGTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

```

10 [0057] Указания на тау включают известные природные вариации примерно 30 из которых
занесены в базу данных Swiss-Prot и их пермутации, а также мутации, патологии,
ассоциированные с тау, такие как деменция, болезнь Пика, надъядерный паралич и т.д. (см.,
например, базу данных Swiss-Prot и Poorkaj, et al. Ann Neurol. 43:815-825 (1998)). Некоторые
15 примеры мутаций тау, пронумерованные по изоформе 441, представляют собой мутацию
лизина на треонин в аминокислотном остатке 257 (K257T), мутацию изолейцина на валин в
аминокислотной позиции 260 (I260V); мутацию глицина на валин в аминокислотной позиции
272 (G272V); мутацию аспарагина на лизин в аминокислотной позиции 279 (N279K);
мутацию аспарагина на гистидин в аминокислотной позиции 296 (N296H); мутацию пролина
на серин в аминокислотной позиции 301 (P301S); мутацию глицина на валин в
20 аминокислотной позиции 303 (G303V); мутацию серина на аспарагин в позиции 305 (S305N);
мутацию глицина на серин в аминокислотной позиции 335 (G335S); мутацию валина на
метионин в позиции 337 (V337M); мутацию глутаминовой кислоты на валин в позиции 342
(E342V); лизина на изолейцин в аминокислотной позиции 369 (K369I); глицина на аргинин в
аминокислотной позиции 389 (G389R); и аргинина на триптофан в аминокислотной позиции
25 406 (R406W).

[0058] Тау может фосфорилироваться по одному или более аминокислотных остатков,
включая тирозин в аминокислотных позициях 18, 29, 97, 310 и 394, серин в аминокислотных
позициях 184, 185, 198, 199, 202, 208, 214, 235, 237, 238, 262, 293, 324, 356, 396, 400, 404, 409,
412, 413 и 422; и треонин в аминокислотных позициях 175, 181, 205, 212, 217, 231 и 403.

30 III. Антитела

A. Специфичность связывания и функциональные свойства

[0059] В изобретении предложены антитела, которые связываются с тау. Некоторые
антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 23-46

последовательности SEQ ID №:1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 25-44 последовательности SEQ ID №:1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах 28-41 последовательности SEQ ID №:1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 30-39 последовательности SEQ ID №:1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 30-36 последовательности SEQ ID №:1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 33-39 последовательности SEQ ID №:1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 33-36 последовательности SEQ ID №:1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом, включая остатки 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36, 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41, 30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40, 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 последовательности SEQ ID №:1. Некоторые антитела связываются с тау независимо от состояния фосфорилирования. Некоторые антитела связываются с эпитопом, не включая остаток, подвергшийся фосфорилированию. Данные антитела можно получить путем иммунизации полипептидом тау, выделенным из природного источника или полученным путем рекомбинантной экспрессии. Антитела можно подвергать скринингу в отношении связывания с тау в нефосфорилированной форме, а также в форме, в которой один или более остатков, поддающихся фосфорилированию, являются фосфорилированными. Такие антитела предпочтительно связываются с неотличимой аффинностью или по меньшей мере с коэффициентом 1,5, 2 или 3-раза с фосфорилированным тау по сравнению с нефосфорилированным тау (*m.e.*, являются "пан-специфическими"). Антитело 16B5 является примером пан-специфического моноклонального антитела. Настоящее изобретение также предлагает антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и любые из вышеуказанных антител, таких как, например, с эпитопом для 16B5. Также включены антитела, конкурирующие за связывание с тау с любым из вышеуказанных антител, таких как, например, конкурирующие с 16B5.

[0060] Вышеуказанные антитела можно получить *de novo* путем иммунизации пептидом, содержащим остатки 23-46, 25-44, 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36, 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41,

30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40, 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 последовательности SEQ ID №:1, или путем
5 иммунизации полноразмерным полипептидом тау или его фрагментом, содержащим такие остатки, и путем скрининга в отношении специфического связывания с пептидом, включающим такие остатки. Такие пептиды предпочтительно присоединены к гетерогенной конъюгированной молекуле, которая способствует выработке антительного ответа на пептид. Присоединение может напрямую или через спейсерный пептид или аминокислоту. Цистеин
10 применяют в качестве спейсерной аминокислоты, потому что его свободная SH-группа облегчает прикрепление к молекуле-носителю. Также можно применять полиглициновый линкер (*например*, 2-6 глицинов), с наличием или отсутствием остатка цистеина между глицинами, и пептид. Молекула-носитель служит для обеспечения Т-клеточного эпитопа, который способствует выработке антительного ответа на пептид. Некоторые носители
15 широко используются, в частности, гемоцианин фисуреллы (KLH), овальбумин и бычий сывороточный альбумин (БСА). Пептидные спейсеры можно добавлять к пептидному иммуногену при твердофазном пептидном синтезе. Носители обычно добавляют путем химического сшивания. Некоторые примеры химических сшивающих агентов, которые можно применять, включают сложный эфир кросс-N-малеимидо-6-аминокапроила или m-
20 малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид (MBS) (см., например, Harlow, E. et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1988; Sinigaglia et al., *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz et al., *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer et al., *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. et al., *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; и, Southwood et al. *J. Immunology*, 160:3363-3373 (1998)). При наличии носителя и спейсера, они могут прикрепляться к любому концу иммуногена.

[0061] Пептид необязательно со спейсером и носителем можно применять для иммунизации лабораторных животных или В-клеток, как описано более подробно ниже. Супернатанты гибридом можно проверять на способность связывать один или более пептидов, включающие остатки 24-46, 25-44, 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36,
30 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41, 30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40,

- 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 последовательности SEQ ID №:1, и/или фосфорилированные и нефосфорилированные формы тау, такие как, например, в полноразмерные изоформы тау с позицией 404 в фосфорилированной форме. Пептид может
- 5 быть присоединен к носителю или другой метке для облегчения скрининг-анализа. В этом случае носитель или метка предпочтительно отличаются от комбинации спейсера и молекулы-носителя, применяемых для иммунизации, чтобы устранить антитела, специфичные для спейсера или носителя, а не пептида тау. Можно применять любую из изоформ тау.
- 10 **[0062]** Антитела, имеющие специфичность связывания выбранного антитела мыши (*например*, 16B5), также можно получить с помощью варианта метода фагового дисплея. См. *Winter*, WO 92/20791. Данный способ особенно подходит для получения антител человека. В данном способе в качестве исходного материала применяют переменную область тяжелой или легкой цепи выбранного антитела мыши. Если, например, в качестве
- 15 исходного материала выбрана переменная область легкой цепи, построена фаговая библиотека, члены которой отображают одну и ту же переменную область легкой цепи (*т.е.*, исходный материал мыши) и отличную переменную область тяжелой цепи. Переменные области тяжелой цепи, например, можно получить в библиотеке перестроенных переменных областей тяжелой цепи человека. Выбирают фаг,
- 20 обнаруживающий сильное специфическое связывание с требуемой мишенью (*например*, тау пептидом) (*например*, по меньшей мере 10^8 и предпочтительно по меньшей мере 10^9 M⁻¹). Переменная область тяжелой цепи из этого фага затем служит в качестве исходного материала для конструирования дополнительной фаговой библиотеки. В данной библиотеке каждый фаг отображает одну и ту же переменную область тяжелой цепи (*т.е.*, область,
- 25 идентифицированную в первой фаговой библиотеке) и отличную переменную область легкой цепи. Переменные области легкой цепи можно получить, например, из библиотеки перестроенных переменных областей легкой цепи. И снова выбирают фаг, обнаруживающий сильное специфическое связывание с требуемой мишенью. Полученные антитела обычно имеют одинаковую или схожую эпитопную специфичность, что и исходный
- 30 материал мыши.
- [0063]** Другие антитела можно получить путем мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелые и легкие цепи типичного антитела, такого как 16B5. В изобретение также включены

моноклональные антитела, которые по меньшей мере 90%, 95% и 99% идентичны аминокислотной последовательности зрелых вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепи 16B5 и поддерживают свои функциональные свойства, и/или которые отличаются от соответствующих антител на небольшое количество функционально несущественных аминокислотных замен (*например*, консервативных замещений), делеций или вставок. Также включены моноклональные антитела, имеющие по меньшей мере одну и предпочтительно все шесть CDR, как определено по Кабату, которые на 90%, 95%, 99% или 100% идентичны соответствующим CDR 16B5.

В. Антитела видов, не относящихся к человеку

10 [0064] Получение других нечеловеческих моноклональных антител, например, мыши, морских свинок, приматов, кроличьих или крысиных против иммуногена можно осуществить, например, путем иммунизации животного иммуногеном, как описано выше. См. Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (включено в качестве ссылки для всех целей). Такой иммуноген можно получить из природного источника, путем

15 пептидного синтеза или рекомбинантной экспрессии.

[0065] Необязательно, иммуноген можно вводить с адъювантом. Может применять несколько типов адъюванта, как описано ниже. Полный адъювант Фрейнда с последующим неполным адъювантом является предпочтительным для иммунизации лабораторных животных. Для получения поликлональных антител обычно применяют кроликов или

20 морских свинок. Для получения моноклональных антител обычно применяют мышей. Проводят скрининг антител на специфическое связывание. Необязательно далее проводят скрининг антител на связывание с конкретной областью тау. Такой скрининг можно осуществить путем определения связывания антитела с коллекцией мутантов с делецией тау и определением того, какие мутанты с делецией связываются с антителом. Связывание

25 можно оценить, например, с помощью вестерн-блоттинга, флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS™) или ИФА.

С. Гуманизированные антитела

[0066] Гуманизированное антитело представляет собой генно-инженерное антитело, в котором CDR от нечеловеческого "донорного" антитела (*например*, 16B5) привиты на

30 последовательности "акцепторных" антител человека (см., *например*, Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539, Carter, US 6407213, Adair, US 5859205 6881557, Foote, US

6881557). Последовательности акцепторного антитела могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, композицию таких последовательностей, консенсусную последовательность антител человека или последовательность зародышевой области (germline region sequence). Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее несколько или все CDR, полностью или в значительной степени из донорного антитела, и последовательности переменных областей каркасных участков и константные области, если они присутствуют, полностью или в значительной степени из последовательностей антител человека. Аналогично гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR, полностью или в значительной степени из тяжелой цепи донорного антитела, и последовательность переменной области каркасного участка тяжелой цепи (heavy chain variable region framework sequence) и константную область тяжелой цепи, если они присутствуют, в значительной степени из последовательности переменной области каркасного участка тяжелой цепи и последовательности константной области человека. Аналогично гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR, полностью или в значительной степени из легкой цепи донорного антитела, и последовательность переменной области каркасного участка легкой цепи и константную область легкой цепи, если они присутствуют, в значительной степени из последовательностей переменной области каркасного участка легкой цепи и последовательности константной области человека. Кроме нанотел и dAb, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе в значительной степени из соответствующей CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено по Кабату) идентичны между соответствующими CDR. Последовательность переменной области каркасного участка цепи антитела или константная область цепи антитела состоит в значительной степени из последовательности переменной области каркасного участка человека или константной области человека, соответственно, когда по меньшей мере идентичны 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков, как определено по Кабату.

[0067] Хотя гуманизированные антитела часто включают все шесть CDR (предпочтительно как определено по Кабату) из антитела мыши, они также могут состоять из менее чем всех CDR, (например, по меньшей мере 3, 4 или 5) CDR из антитела мыши (например, Pascalis *et al.*, J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos *et al.*, Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002;

Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al, Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000).

[0068] В некоторых антителах только часть CDR, а именно, подмножество остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR, необходимы для сохранения связывания в гуманизованном антителе. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и не в SDR, могут быть определены на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDR H2 часто не требуются), из областей CDR Кабата, лежащих за пределами гипервариабельных петель Чотиа (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), их молекулярного моделирования и/или эмпирически, или как описано в Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 10 2004. В таких гуманизованных антителах в позициях, в которых отсутствует один или более донорских остатков CDR или в которых опущен весь донор CR, аминокислота, занимающая позицию, может представлять собой аминокислоту, занимающую соответствующую позицию (по нумерации Кабата) в последовательности акцепторного антитела. Число таких замещений акцептора для донорных аминокислот в CDR для 15 включения отражает баланс конкурирующих факторов. Такие замены потенциально выгодны для уменьшения количества аминокислот мыши в гуманизованном антителе и вследствие этого уменьшения потенциальной иммуногенности. Тем не менее, замены могут также вызвать изменения аффинности и предпочтительно избегать значительного снижения аффинности. Позиции для замещения в пределах CDR и аминокислоты для замещения также 20 можно выбрать эмпирически.

[0069] Последовательности акцепторного антитела человека необязательно могут быть выбраны из множества известных последовательностей антител человека для обеспечения высокой степени идентичности последовательности (*например*, 65-85% идентичности) между акцепторной последовательностью вариабельной области каркасных участков человека и 25 соответствующими вариабельными областями каркасных участков цепи донорного антитела.

[0070] Некоторые аминокислоты из остатков вариабельной области каркасного участка человека могут быть выбраны для замещения на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование такого возможного влияния осуществляется путем моделирования, оценки характеристик аминокислот в конкретных 30 местах, или путем эмпирических наблюдений эффектов замещения или мутагенеза конкретных аминокислот.

5 [0071] Например, когда аминокислота в остатке вариабельной области каркасного участка
мышцы отличается от выбранного остатка вариабельной области каркасного участка человека,
аминокислота в каркасном участке человека может быть заменена эквивалентной
аминокислотой каркасной области из антитела мыши, когда разумно ожидать, что

- (1) непосредственно нековалентно связывается с антигеном,
- (2) является смежной с областью CDR,
- (3) иным способом взаимодействует с областью CDR (*например*, находится
10 примерно в 6 Å от области CDR), (*например*, определена путем моделирования
легкой или тяжелой цепи на раскрытой структуре гомологичной цепи
известного иммуноглобулина); и
- (4) остаток участвует в зоне контакта VL-VH.

15 [0072] Остатки каркасного участка классов (1)-(3), как определено по Квину, US 5530101,
иногда иначе называют каноническим и верньерными остатками. Остатки каркасного участка,
устанавливающие канонический класс CDR донорной петли и определяющие конформацию
CDR петли, иногда называют каноническими остатками (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196,
901-917 (1987), Thornton & Martin *J. Mol. Biol.*, 263, 800-815, 1996). Слой остатков каркасного
участка, который поддерживает антигенсвязывающую конформацию петли, играющий роль в
тонкой настройке подгонки антитела к антигену, иногда называют верньерными остатками
20 (Foote & Winter, 1992, *J Mol Bio.* 224, 487-499). Другими кандидатами для замещения
являются остатки, создающие потенциальный сайт гликозилирования. Другими кандидатами
для замещения являются акцепторные аминокислоты каркасного участка человека, которые
необычны для данного положения в иммуноглобулине человека. Эти аминокислоты могут
быть замещены аминокислотами из эквивалентной позиции донорного антитела мыши или из
25 эквивалентных позиций более типичных иммуноглобулинов человека. Другими кандидатами
на замещения являются акцепторные аминокислоты каркасного участка человека, которые
необычны для данного положения в иммуноглобулине человека.

[0073] Изобретение относится к гуманизированным формам антитела мыши 16B5.
Антитело мыши содержит аминокислотные последовательности зрелых вариабельных
30 областей тяжелой и легкой цепи, содержащие SEQ ID № 10 и 16, соответственно. В

изобретении предложены одна иллюстративная гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи (H1) и три иллюстративных гуманизованных зрелых переменных области легкой цепи (L1, L2 и L3). Вариант H1L2 имеет такую же или лучшую аффинность как химерное 16B5 и семь обратных мутаций. H1L1 и H1L3 имеет аналогичную аффинность как химерное 16B5 и шесть обратных мутаций.

[0074] Изобретение обеспечивает варианты H1L2 гуманизованного антитела 16B5, в которой гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID №:15 гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID №:22. Предпочтительно в таких антителах сохраняются некоторые или все из обратных мутаций в H1L2. Другим словами, по меньшей мере 1, 2, или 3 позиции H13 заняты К, позиция H48 занята М и позиция H91 занята F. Предпочтительно по меньшей мере, 1, 2, 3 или все четыре позиции L1 заняты N, позиция L4 занята L, позиция L36 занята F и позиция L43 занята S. Области CDR таких гуманизованных антител предпочтительно идентичны или по существу идентичны CDR областям H1L2, которые являются такими же, как в донорном антителе мыши. Области CDR могут быть определены с помощью любого обычного определения (*например*, Чотиа), но предпочтительно, как определено по Кабату.

[0075] Одна из возможностей для дополнительного изменения в вариантах 16B5 представляет собой дополнительные обратные мутации в переменной области каркасных участков. Многие из каркасных остатков, не контактирующие с CDR в гуманизованном моноклональном антителе, могут содержать аминокислотные замены из соответствующих позиций донорного моноклонального антитела мыши или других антител мыши или человека, и даже многие из остатков, потенциально контактирующих с CDR, также поддаются замещению, или даже аминокислоты в CDR могут быть изменены, например, на остатки, находящиеся в соответствующей позиции акцепторной последовательности человека, применяются для обеспечения переменной области каркасных участков. Кроме того, альтернативные акцепторные последовательности человека можно применять, например, для тяжелой и/или легкой цепи. Если применяют различные акцепторные последовательности, то одну или более обратных мутаций, рекомендуемых выше, не возможно выполнить, потому что соответствующие донорные и акцепторные остатки уже одинаковы без обратной мутации. Например, при использовании акцепторной

последовательности тяжелой цепи, в которой позиция H13 уже занята К, уже не нужна обратная мутация.

5 [0076] Изобретение также включает гуманизированные антитела, в которых зрелые переменные области легкой и тяжелой цепи имеют по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности со зрелыми переменными областями легкой и тяжелой цепи гуманизированного антитела 16B5 H1L1 (SEQ ID №: 21 и 15, соответственно) или гуманизированного антитела 16B5 H1L3 (SEQ ID №: 23 и 15, соответственно).

D. Химерные и венированные антитела

10 [0077] В настоящем изобретении также предложены химерные и венированные формы антител видов, не относящихся к человеку, в частности антитела 16B5.

[0078] Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые переменные области легкой и тяжелой цепей антитела вида, не относящегося к человеку, (*например*, мыши) скомбинированы с константными областями легкой и тяжелой цепей человека. Такие антитела существенно или полностью сохраняют специфичность связывания антитела мыши и примерно две трети последовательности человека.

15 [0079] Венированное антитело представляет собой тип гуманизированного антитела, которое сохраняет некоторые и обычно все CDR, и некоторые из остатков нечеловеческой переменной области каркасных участков нечеловеческого антитела, но заменяет другие остатки переменной области каркасных участков, которые могут вносить вклад в эпитопы В- или Т-клеток, например, остатки, подвергшиеся воздействию (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991), на остатки на соответствующих позициях последовательности антитела человека. В результате получается антитело, в котором CDR полностью или в большей степени образовано из нечеловеческого антитела, и переменные области каркасных участков нечеловеческого антитела сделаны более очеловеченными благодаря заменам.

20 Венированные формы любого антитела 16B5 включены в настоящее изобретение.

E. Антитела человека

[0080] Антитела человека к тау получают при помощи различных методов, описанных ниже. Способы получения антител человека включают триомный (trioima) способ из Oestberg et al., *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, патент США № 4634664; и Engleman et al., патент США № 4634666, применение трансгенных мышей, включая гены иммуноглобулина

30

человека (см., *например*, Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5877397, US 5874299, US 5814318, US 5789650, US 5770429, US 5661016, US 5633425, US 5625126, US 5569825, US 5545806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) и способы фагового дисплея (см., *например*, Dower et al., WO 91/17271 и
5 McCafferty et al., WO 92/01047, US 5877218, US 5871907, US 5858657, US 5837242, US 5733743 и US 5565332.

F. Выбор константной области

[0081] Вариабельные области тяжелой и легкой цепи из химерных, гуманизированных (включая венированные) или антител человека могут быть соединены по меньшей мере с
10 частью константной области человека. Выбор константной области зависит, в частности, требуется ли антителозависимая комплемент и/или клеточно-опосредованная цитотоксичность. Например, изотипы человека IgG1 и IgG3 обладают комплемент-опосредованной цитотоксичностью, тогда как изотипы человека IgG2 и IgG4 не имеют или имеют слабую комплемент-опосредованную цитотоксичность. Константные области легких
15 цепей могут быть лямбда или каппа. Антитела могут экспрессироваться как тетрамеры, содержащие две легкие и две тяжелые цепи, как отдельные тяжелые цепи, легкие цепи, как Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, или одноцепочечные антитела, в которых вариабельные области тяжелой и легкой цепи соединены через спейсер.

[0082] Константные области человека показывают аллотипическую вариацию и
20 изоаллотипическую вариацию между разными индивидуумами, то есть константные области могут отличаться у разных индивидуумов в одной или более полиморфных позициях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов в том, что в сыворотке, распознающей изоаллотип, связываются с непалиморфной областью одного или более других. Ссылка на константную область человека включает константную область с любым природным аллотипом или любой
25 перестановкой остатков, занимающих полиморфные позиции в природных аллотипах, или до 3, 5 или 10 замен для уменьшения или увеличения эффекторной функции, как описано ниже.

[0083] Одна или несколько аминокислот на амино- или карбоксильном конце легкой и/или тяжелой цепи, например, таком как С-концевой лизин тяжелой цепи, могут быть опущены, или могут быть получены производные для части или всех молекул. Замены могут
30 происходить в константных областях для уменьшения или увеличения эффекторной функции, такой как комплемент-опосредованная цитотоксичность или антителозависимая

клеточная цитотоксичность (ADCC) (см., *например*, Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597; и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), или для продления периода полураспада в организме человека (см., *например*, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Примеры замен включают глутамин в позиции 250 и /или лейцин в позиции 428 (в этом параграфе для константной области используется нумерация ЕС) для увеличения периода полураспада антитела. Замена любой или всех позиций 234, 235, 236 и /или 237 уменьшает аффинность рецепторов Fcγ, в частности рецептора FcγRI (см., *например*, US 6624821). Замена аланина в позициях 234, 235 и 237 IgG1 человека является предпочтительной для снижения эффекторных функций. Необязательно, позиции 234, 236 и/или 237 в IgG2 человека замещены на аланин и позиция 235 на глутамин. (См., *например*, US 5624821.)

G. Экспрессия рекомбинантных антител

[0084] Химерные, гуманизированные (включая венеризированные) и антитела человека обычно получают путем рекомбинантной экспрессии. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, можно оптимизировать в отношении кодонов для экспрессии в желаемом типе клеток (*например*, CHO или Sp2/0). Нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизированные переменные области тяжелой и легкой цепи 16B5, описанные в настоящей заявке, имеют последовательности, содержащие или состоящие, например, из SEQ ID №: 25 (кодирует Hu16B5 H1), SEQ ID №: 26 (кодирует Hu16B5 L1), SEQ ID №: 27 (кодирует Hu16B5 L2), или SEQ ID №: 28 (кодирует Hu16B5 L3). Для переменных областей, включая сигнальные пептиды, таких как SEQ ID № 10 и 16, нуклеиновая кислота может кодировать переменную область с наличием или отсутствием сигнального пептида. Сегменты нуклеиновых кислот, кодирующие тяжелую и легкую цепь, могут присутствовать на той же сопряженной молекуле нуклеиновой кислоты или на отдельных молекулах. Тяжелые и легкие цепи могут экспрессироваться одним и тем же вектором или различными векторами. Нуклеиновые кислоты обычно предлагаются в выделенном виде.

[0085] Нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизированные переменные области тяжелой цепи 16B5, могут быть соединены с сегментом нуклеиновой кислоты, кодирующим константную область IgG1 человека, *например*, имеющую последовательность SEQ ID №: 30. Такие нуклеиновые кислоты могут также содержать интрон, расположенный между сегментами, кодирующими переменную область тяжелой цепи и константную область

IgG1, *m.e.*, от 5' к сегменту, кодирующему константную область. Иллюстративная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая константную область IgG1 человека и имеющая интрон мыши на своем 5'-конце, показана в SEQ ID №: 31.

5 [0086] Нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизированные переменные области легкой цепи 16B5, могут быть соединены с сегментом нуклеиновой кислоты, кодирующим каппа-константную область человека, *например*, имеющую последовательность SEQ ID №: 33. Такие нуклеиновые кислоты также могут содержать интрон между сегментами, кодирующими переменную область легкой цепи и каппа-константную область (*m.e.*, от 5' к каппа-константной области). Иллюстративная последовательность нуклеиновой кислоты, 10 кодирующая каппа-константную область человека и имеющая интрон человека на своем 5'-конце, показана в SEQ ID №: 34.

[0087] Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно включают последовательность, контролирующую экспрессию, функционально связанную с последовательностями, кодирующими цепи антитела, включая природно-ассоциированные 15 или гетерологичные промоторные области. Предпочтительные последовательности, контролирующие экспрессию, представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных к трансформации или трансфекции эукариотических клеток-хозяев. После того, как вектор включили в соответствующего хозяина, хозяина выдерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей 20 и сбора и очистки перекрестно реагирующих антител. Вектор или векторы, кодирующие цепи антител, могут также содержать селективируемый ген, например, ген дигидрофолатредуктазы или глутаминсинтетазы, который разрешает амплификацию числа копий нуклеиновых кислот, кодирующих цепи антитела.

[0088] *E. coli* представляет собой прокариотическую клетку-хозяина особенно подходящую 25 для экспрессии антител, в частности фрагментов антител. Микроорганизмы, такие как дрожжи, также пригодны для экспрессии. *Saccharomyces* является предпочтительным дрожжевым хозяином, с подходящими векторами, имеющими последовательности, контролирующие экспрессию, ориджин репликации, последовательности терминации и тому подобное по необходимости. Типичные промоторы содержат 3-фосфоглицераткиназу и 30 другие гликолитические ферменты. Индуцируемые промоторы дрожжей включают, помимо

прочих, промоторы алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома С и ферментов, ответственных за использование мальтозы и галактозы.

[0089] Клетки млекопитающих являются предпочтительными хозяевами для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. Winnacker, 5 From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). В данной области техники разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и они включают клеточные линии CHO, различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки НЕК293, L-клетки, и клетки миеломы, не продуцирующие антитела, включая Sp2/0 и NS0. Предпочтительно клетки являются нечеловеческими. Векторы экспрессии для данных 10 клеток могут содержать последовательности, контролирующие экспрессию, такие как ориджин репликации, промотор, энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), и необходимые информационные сайты процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Предпочтительные последовательности, контролирующие экспрессию, 15 представляют собой промоторы, полученные из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, вируса папилломы крупного рогатого скота и т.п. См. Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

[0090] После введения вектора(ов), кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела, в культуру клеток, клеточный пул можно подвергнуть скринингу на рост производительности 20 и качество продука в бессывороточной среде. Высоко продуктивные клеточные пулы затем могут быть подвергнуты клонированию отдельных клеток на основании FACS-анализа для получения моноклональных линий. Предпочтительными являются удельные производительности выше 50 пг или 100 пг на клетку в день, которые соответствуют титру продукции в более 7,5 г/л культуры. Антитела, полученные из клонов одной клетки, также 25 могут быть проверены на мутность, фильтрационные свойства, при помощи ПААГ, ИЭФ, УФ-сканирования, высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HP-SEC), олигосахаридного картирования, масс-спектрометрии и анализа на связывание, такого как ИФА или Вiascore анализа. Затем выбранный клон можно распределить по нескольким флаконам и хранить в замороженном виде для дальнейшего использования.

[0091] После экспрессии антитела можно очищать в соответствии со стандартными 30 процедурами данной области техники, включая захват белком А, хроматографию на колонке

(например, гидрофобное взаимодействие или ионообменное), низкий pH для инактивации вирусов и т.п. (в общем см., Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

5 [0092] Можно применять методы коммерческого производства антител, включая оптимизацию кодонов, выбор промоторов, элементов транскрипции и терминаторов, клонирование единичных клеток в бессывороточной среде, создание банка клеток, применение селективных маркеров для амплификации числа копий, СНО терминатора, клонирование единичных клеток в среде с сывороткой, улучшение титра белка (см., например, US 5786464, US 6114148, US 6063598, US 7569339, WO2004/050884, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2005/019442, WO2008/107388 и WO2009/027471 и US 10 5888809).

IV. Активные иммуногены

15 [0093] Агент, применяемый для активной иммунизации, служит для индукции у пациента таких же типов антител, описанных выше, в связи с пассивной иммунизацией. Агенты, применяемые для активной иммунизации, могут представлять собой такие же типы иммуногенов, применяемые для образования моноклональных антител у лабораторных животных, например, пептид из 3-15 или 3-12 или 5-12, или 5-8 последовательных аминокислот из области тау, соответствующих остаткам 23-46, 25-44, 28-41 или 30-39 последовательности SEQ ID № 1, такой как, например, пептид, содержащий остатки 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36, 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 20 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41, 30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40, 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 последовательности SEQ ID №:1. Для индуцируемых антител, связывающихся с тем же или перекрывающимся эпитопом 16B5, можно отобразить эпитопную специфичность данных антител (например, путем проверки связывания с серией перекрывающихся пептидов, охватывающих тау). Фрагмент тау, состоящий или включающий или перекрывающийся с эпитопом, можно применять в качестве иммуногена. Такие фрагменты обычно применяют в нефосфорилированной форме.

30 [0094] Если применяется гетерологичный носитель и адъювант, то он может быть таким же, как для генерации моноклональных антител, но также может быть выбран для лучшей

фармацевтической пригодности для применения людьми. Подходящие носители включают сывороточные альбумины, гемоцианин фисуреллы, молекулы иммуноглобулина, тироглобулин, овальбумин, столбнячный анатоксин или анатоксин других патогенных бактерий, таких как дифтерийная палочка (*например*, CRM197), *E. coli*, холерный вибрион или *H. pylori*, или ослабленное производное токсина. Т-клеточные эпитопы также являются подходящими молекулами-носителями. Некоторые конъюгаты можно получить путем связывания агентов согласно изобретению с иммуностимулирующей полимерной молекулой (*например*, трипальмитоил-S-глицерилцистеином (Pam₃Cys), маннаном (полимером маннозы) или глюканом (α β 1 \rightarrow 2 полимером)), цитокинами (*например*, IL-1, IL-1 альфа и β пептидами, IL-2, γ -INF, IL-10, GM-CSF), и хемокинами (*например*, MIP1- α и β , и регулируемый при активации, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т-клетками (RANTES)). Иммуногены могут быть соединены с носителями с наличием или отсутствием спейсерных аминокислот (*например*, глицин-глицин). Дополнительные носители включают вирусоподобные частицы. Вирусоподобные частицы (VLP), называемые также псевдовирioны или производные вирусных частиц, представляют собой субъединичные структуры, состоящие из нескольких копий вирусного капсида и/или белка оболочки, способных к самостоятельной сборке *in vivo* в VLP в определенной сферической симметрии. (Powilleit, et al., (2007) PLoS ONE 2(5):e415.) Альтернативно, пептидные иммуногены могут быть связаны по меньшей мере с одним искусственным Т-клеточным эпитопом, способным связываться с большей частью молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса II, например, пан DR-эпитоп ("PADRE"). PADRE, описан в US 5736142, WO 95/07707, и Alexander J et al, Immunity, 1:751-761 (1994). Активные иммуногены могут быть представлены в многомерной форме, в которой несколько копий иммуногена и/или его носитель представлены как одна ковалентная молекула.

25 [0095] Фрагменты часто вводят с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Адьювант увеличивает титр индукции антител и/или аффинность связывания индуцированных антител по сравнению со случаем, когда пептид применяют один. Для выработки иммунного ответа можно применять разнообразные адьюванты в сочетании с иммуногенным фрагментом тау. Предпочтительные адьюванты увеличивают характерную реакцию на иммуноген, не вызывая конформационных изменений в иммуногене, которые влияют на качественный вид ответа. Предпочтительные адьюванты включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия, 3-де-О-ацелированный

30

монофосфориллипид А (MPLTM) (смотри, GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Гамильтон, Монтана, в настоящее время часть Corixa). Стимулон StimulonTM QS-21 это тритерпеновый гликозид или сапонин, выделенный из коры дерева *Quillaja Saponaria Molina*, найденного в Южной Америке (смотри, Kensil *et al.*, in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5057540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; now Antigenics, Inc., New York, NY). Другие адъюванты представляют собой эмульсии масла в воде (такие как сквален или арахисовое масло), необязательно в комбинации с иммуностимуляторами, такими как монофосфориллипид А (смотри, Stoute *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), плюроновые полимеры и убитые микобактерии. Адъюванты Ribi представляют собой эмульсии масла в воде. Ribi содержит метаболизируемое масло (сквален), эмульгированное с физиологическим раствором, содержащим твин 80. Ribi также содержит очищенные микобактериальные продукты, которые действуют как иммуностимуляторы, и бактериальный монофосфориллипид А. Другой адъювант представляет собой CpG (WO 98/40100). Адъюванты могут вводиться в качестве компонента терапевтической композиции с активным веществом, или могут вводиться отдельно, до, одновременно или после введения терапевтического агента.

[0096] Также могут применяться аналоги природных фрагментов тау, которые вызывают антитела к тау. Например, в таких пептидах одна или более или все L-аминокислоты могут быть замещены D-аминокислотами. Порядок аминокислот также может быть изменен в противоположном направлении (ретропептид). Необязательно пептид содержит все D-аминокислоты в обратном порядке (ретро-инверсный пептид). Пептиды и другие соединения, которые не обязательно имеют значительное сходство с аминокислотной последовательностью с пептидами тау, но тем не менее служат как имитаторы пептидов тау, вызывают подобный иммунный ответ. Также могут применяться антиидиотипические антитела к моноклональным антителам к тау, как описано выше. Такие анти-Id антитела имитируют антиген и вызывают иммунный ответ на него (смотри, *Essential Immunology*, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., p. 181).

[0097] Пептиды (и необязательно носитель, сшитый с пептидом) можно также вводить в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид и экспрессирующейся у пациента *in situ*. Сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий иммуноген, обычно связан с регуляторными элементами, такими как промотор и энхансер, которые разрешают экспрессию сегмента ДНК в желаемых клетках-мишенях пациента. Для экспрессии в клетках крови, что желательно для

индукции иммунного ответа, элементы промотора и энхансера из генов легких или тяжелых цепей иммуноглобулина или главный предранний промотор и энхансер ЦМВ, пригодны для управления экспрессией. Связанные регуляторные элементы и кодирующие последовательности часто клонируют в вектор. Антитела также можно вводить в форме нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи антитела. Если присутствуют обе тяжелые и легкие цепи, предпочтительно цепи связаны как одноцепочечное антитело. Антитела для пассивного введения также можно получить, например, с помощью аффинной хроматографии из сыворотки пациентов, получавших пептидные иммуногены.

[0098] ДНК может доставляться в открытом виде (*т.е.*, без коллоидных или инкапсулирующих материалов). Альтернативно можно применять несколько вирусных векторных систем, включая ретровирусные системы (см., *например*, Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)); аденовирусные векторы {см., *например*, Bett et al, J. Virol. 67, 591-1 (1993)}; адено-ассоциированные вирусные векторы {см., *например*, Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)}, вирусные векторы из семейства поксвирусов, включая вирус осповакцины и вирус птичьей оспы, вирусные векторы из рода альфа-вирусов, такие как производные вирусов Синдбис и леса Семлики (см., *например*, Dubensky et al., J. Virol. 70, 508-519 (1996)), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (see US 5643576) и рабдовирусы, такие как вирус везикулярного стоматита (см. WO 96/34625) и папилломавирусы (Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo et al, WO 94/12629 and Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)).

[0099] ДНК, кодирующую иммуноген, или содержащий ее вектор, можно упаковать в липосомы. Подходящие липиды и родственные аналоги описаны в патентах US 5208036, US 5264618, US 5279833 и US 5283185. Векторы и ДНК, кодирующие иммуноген, также можно адсорбировать или связать с носителями в виде частиц, примеры которых включают полиметилметакрилатные полимеры и полилактиды и сополимеры лактида и гликолида, (см., *например*, McGee et al., J. Micro Encap. 1996).

V. Методы скрининга

[0100] Антитела можно первоначально подвергать скринингу в отношении предполагаемой специфичности связывания, как описано выше. Активные иммуногены также можно подвергать скринингу на способность индуцировать антитела с такой специфичностью связывания. В данном случае активный иммуноген применяют для иммунизации

лабораторного животного и полученную сыворотку тестируют на соответствующую специфичность связывания.

5 [0101] Антитела, имеющие требуемую специфичность связывания, затем можно тестировать на клеточных и животных моделях. Клетки, применяемые для такого скрининга, преимущественно представляют собой нервные клетки. Сообщалось о клеточной модели патологии тау, в которой клетки нейробластомы трансфецировали четырьмя повторными доменами тау, необязательно с мутацией, ассоциированной с патологией тау (*например*, дельта K280, смотри Khlistunova, Current Alzheimer Research 4, 544-546 (2007)). В другой модели, тау индуцируется в клеточной линии нейробластомы N2a путем добавления доксициклина. Клеточные модели позволяют изучать токсичность тау для клеток в растворимом или агрегированном состоянии, внешний вид агрегатов тау после включения экспрессии гена тау, растворение агрегатов тау после повторного включения экспрессии гена, и эффективность антител ингибировать образование агрегатов тау или дезагрегировать их.

15 [0102] Антитела или активные иммуногены также можно подвергать скринингу в трансгенных животных моделях заболеваний, ассоциированных с тау. Такие трансгенные животные могут содержать трансген тау (*например*, любую из изоформ человека) и, необязательно, трансген APP человека среди других, такие как киназа, которая фосфорилирует тау, ApoE, пресенилин или синуклеин. Такие трансгенные животные предрасположены к развитию у них по меньшей мере одного симптома или признака заболевания, ассоциированного с тау.

25 [0103] Иллюстративным трансгенным животным является линия мышей K3 (Itner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(41):15997-6002 (2008)). Данные мыши имеют трансген тау человека с мутацией K 369 I (мутация, ассоциированная с болезнью Пика) и Thy 1.2 промотор. Данная модель показывает быстрый ход нейродегенерации, двигательный дефект и дегенерацию афферентных волокон и гранулярных клеток мозжечка. Другим иллюстративным животным является линия мышей pR5. Данные мыши имеют трансген тау человека с мутацией P301L (мутация, ассоциированная с лобно-височной деменцией) и Thy 1.2 промотор (Taconic, Germantown, N.Y., Lewis, et al., Nat Genet. 25:402-405 (2000)). Эти мыши имеют более плавный ход нейродегенерации. У мышей развиваются нейрофибриллярные клубки в нескольких регионах головного и спинного мозга, что включено во всей своей полноте посредством ссылки. Она представляет собой отличную

модель для изучения последствий развития клубков и скрининга терапии, которая может ингибировать образование данных агрегатов. Еще одно преимущество данных животных заключается в относительно раннем начале патологии. В гомозиготной линии поведенческие аномалии, ассоциированные с патологией тау, можно наблюдать по меньшей мере уже в 3
5 месяца, но животные остаются относительно здоровыми по меньшей мере до 8-месячного возраста. Другими словами, в 8 месяцев животные передвигаются, кормятся и могут выполнять поведенческие задачи достаточно хорошо, чтобы была возможность наблюдения эффекта лечения. Активная иммунизация этих мышей в 6-13 месяцев при помощи AI wI KLN-PHF-1 образует титры примерно 1000 и показывает меньше нейрофибриллярных
10 клубков, меньше pSer422, и уменьшение потери веса по сравнению с необработанными контрольными мышами.

[0104] Активность антител или активных агентов можно оценивать по различным критериям, включая снижение количества общего тау или фосфорилированного тау, уменьшение других патологических характеристик, таких как амилоидные отложения A β , и
15 ингибирование или задержку расстройства поведения. Активные иммуногены также можно проверять на индукцию антител в сыворотке. И активные, и пассивные иммуногены можно проверять на прохождение через антител гематоэнцефалический барьер в головной мозг трансгенного животного. Антитела или фрагменты, индуцирующие антитела, также можно проверять на приматах, кроме человека, у которых естественно или через индукцию
20 развиваются симптомы заболеваний, связанных с тау. Тестирование антитела или активного агента обычно выполняют вместе с контролем, при котором проводят параллельный эксперимент, где отсутствует антитело или активный агент (*например*, заменен на носитель). Уменьшение, задержку или ингибирование признаков или симптомов болезни, связанные с тестируемым антителом или активным агентом, можно оценивать относительно контроля.

25 VI. Пациенты, подлежащие лечению

[0105] Наличие нейрофибриллярных клубков было обнаружено при нескольких заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, умеренные когнитивные нарушения, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическую деменция или деменцию боксеров, болезнь Ниман-Пика типа C, надъядерный паралич, лобно-височную
30 деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, гуамский комплекс амиотрофического бокового склероза и деменции при болезни Паркинсона, и прогрессирующий надъядерный

паралич PSP. Настоящие режимы также можно применять для лечения или профилактики любого из этих заболеваний. Из-за широкой связи между неврологическими заболеваниями и состояниями и тау, настоящие режимы можно применять для лечения или профилактики у любого субъекта, показывающего повышенные уровни тау или фосфорилированного тау (например, в СМЖ), по сравнению со средним значением у лиц без неврологических заболеваний. Настоящие режимы также можно применять для лечения или профилактики неврологических заболеваний у лиц, имеющих мутацию в тау, ассоциированную с неврологическим заболеванием. Настоящие способы в частности пригодны для лечения или профилактики болезни Альцгеймера, и особенно у больных.

5

10 [0106] Пациенты, подлежащие лечению, включают лиц, подверженных риску заболевания, но не проявляющих симптомов, а также пациентов, данный момент проявляющих симптомы. Пациенты с риском заболевания включают тех, которые имеют известный генетический риск заболевания. Такие люди включают тех, чьи родственники пережили эту болезнь, и тех, у кого риск выявили путем анализа генетических или биохимических маркеров. Генетические

15 маркеры риска включают мутации в тау, такие как обсуждались выше, а также другие мутации в генах, связанных с неврологическим заболеванием. Например, аллель ApoE4 в гетерозиготной, а тем более в гомозиготной форме, связана с риском болезни Альцгеймера. Другие маркеры риска болезни Альцгеймера включают мутации в гене APP, в частности в мутации в позиции 717 и позициях 670 и 671, называемые мутациями Харди и шведскими

20 мутациями, соответственно, мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, семейный анамнез болезни Альцгеймера, гиперхолестеринемию или атеросклероз. Лиц, страдающих от болезни Альцгеймера в настоящее время, можно выявить благодаря ПЭТ, из характерной деменции, а также при наличии факторов риска, описанных выше. Кроме того, для выявления лиц с болезнью Альцгеймера доступен ряд диагностических тестов. Они включают измерение

25 уровней тау или фосфо-тау и Aβ42 в СМЖ. Повышенные уровни тау или фосфо-тау и пониженные Aβ42 сигнализируют о наличии болезни Альцгеймера. Некоторые мутации ассоциированы с болезнью Паркинсона. Ala30Pro или Ala53, или мутации в других генах ассоциированы с болезнью Паркинсона, такие как обогащенная лейциновыми повторами киназа, PARK8. Лиц также можно диагностировать на любые неврологические заболевания,

30 упомянутые выше, по критериям Руководства по диагностике и статистике психических расстройств (DSM IV TR).

[0107] У бессимптомных пациентов, лечение можно начинать в любом возрасте (*например*, 10, 20, 30). Тем не менее, обычно нет необходимости начинать лечение до тех пор, пока пациент не достигнет 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение обычно подразумевает введение множественных доз в течение определенного периода времени. Лечение можно контролировать путем анализа уровня антител в динамике по времени. Если ответ падает, показана ревакцинирующая доза. В случае пациентов с потенциальным синдромом Дауна, лечение можно начать антенатально путем введения терапевтического агента матери или вскоре после рождения.

VII. Фармацевтические композиции и способы лечения

10 [0108] Антитело или агент для индукции антител или их фармацевтическую композицию в профилактических целях вводят пациенту, подверженному риску или иным образом с риском заболевания (*например*, болезнь Альцгеймера), в режиме (доза, частота и пути введения), эффективном для снижения риска, уменьшения тяжести или задержки наступления по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В частности, предпочтительно режим эффективен для ингибирования или задержки тау или фосфо-тау и спаренных нитей, образующихся из них в мозге, и/или ингибирования или задержки его токсических эффектов, и/или ингибирования/или задержки развития расстройств поведения. Антитело или агент для индукции антител в целях терапевтических вводят пациенту с подозрением на наличие или уже страдающему от заболевания (*например*, болезнь Альцгеймера) в режиме (доза, частота и пути введения), эффективном для ослабления или по меньшей мере ингибирования дальнейшего ухудшения по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В частности, предпочтительно режим эффективен для уменьшения или по меньшей мере ингибирования дальнейшего увеличения уровней тау, фосфо-тау или спаренных нитей, образующихся из них, связанной токсичности и/или расстройств поведения.

25 [0109] Режим считается терапевтически или профилактически эффективными, если у конкретного пациента, подвергшегося лечению, достигается результат более благоприятный, чем средний результат по сравнению с контрольной популяцией аналогичных пациентов, не подвергавшихся лечению способами согласно настоящему изобретению, или если более благоприятный результат продемонстрирован у пациентов, получавших лечение, по сравнению с контрольными пациентами в контролируемых клинических испытаниях

(например, в фазе II, фазе II/III или фазе III испытаний) при уровне $p < 0,05$ или $0,01$ или даже $0,001$.

5 [0110] Эффективные дозы варьируются в зависимости от многих факторов, таких как способы введения, целевой сайт, физиологическое состояние пациента, является ли пациент носителем AроЕ, является ли пациент человеком или животным, других введенных лекарств, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

10 [0111] Иллюстративный диапазон доз антител составляет примерно от $0,01$ до 5 мг/кг, и чаще от $0,1$ до 3 мг/кг или $0,15-2$ мг/кг или $0,15-1,5$ мг/кг массы тела пациента. Антитела можно вводить в таких дозах ежедневно, через день, раз в неделю, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально или в соответствии с любым другим графиком, определенным эмпирическим путем. Иллюстративное лечение включает введение в многократных дозах в течение длительного периода, например, в течение по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные примеры схем лечения включают введение один раз каждые две недели, или один раз в месяц, или один раз в 3-6 месяцев.

15 [0112] Количество агента для активного введения варьирует от $0,1-500$ мкг на пациента и чаще от $1-100$ или $1-10$ мкг на инъекцию для введения человеку. Расписание инъекций может значительно изменяться от одного раза в день до одного раза в год, одного раза в десять лет. Типичный режим состоит из иммунизации с последующими ревакцинирующими инъекциями с интервалами времени, такими как 6 недельные интервалы или два месяца. Другой режим
20 состоит из иммунизации с последующими ревакцинирующими инъекциями спустя 1, 2 и 12 месяцев. Другой режим состоит из инъекции каждые два месяца в течение жизни. Альтернативно, ревакцинирующие инъекции могут быть нерегулярными на основании мониторинга иммунного ответа.

25 [0113] Антитела или агенты для индукции антител предпочтительно вводят посредством периферического пути, *т.е.*, при котором введенное или индуцированное антитело преодолевает гематоэнцефалический барьер для достижения предназначенного сайта в головном мозге. Пути введения включают местный, внутривенный, пероральный, подкожный, внутриартериальный, внутричерепной, интратекальный, внутрибрюшинный, интраназальный или внутримышечный. Предпочтительные пути введения антител
30 представляют собой внутривенный и подкожный. Предпочтительные пути введения для активной иммунизации представляют собой подкожный и внутримышечный. Данный тип

инъекций наиболее часто выполняют в мышцы рук или ног. В некоторых способах агенты вводят непосредственно в конкретную ткань, где накопились отложения, например, путем внутричерепной инъекции.

5 [0114] Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и по существу изотоническими и изготовлены в соответствии с условиями GMP. Фармацевтические композиции могут быть представлены виде дозированной лекарственной формы (*т.е.*, дозе для однократного введения). Фармацевтические композиции могут быть изготовлены с применением одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ или 10 вспомогательных материалов. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекций, антитела могут быть приготовлены в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический раствор или ацетатный буфер (для уменьшения дискомфорта в месте инъекции). Раствор может содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, 15 стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, антитела могут быть в лиофилизированной форме для разбавления подходящим носителем перед использованием, *например*, стерильной апиrogenной водой.

[0115] Настоящие режимы можно осуществлять в комбинации с введением другого агента, эффективным при лечении или профилактике заболевания, подлежащего лечению. 20 Например, в случае болезни Альцгеймера, настоящие режимы можно комбинировать с иммунотерапией против $A\beta$ (WO/2000/072880), ингибиторами холинэстеразы или мемантином, или в случае болезни Паркинсона с иммунотерапией против альфа-синуклеина WO/2008/103472, с леводопа, агонистами допамина, ингибиторами катехол-О-метилтрансферазы (COMT), ингибиторами MAO-B, амантадином или антихолинергическими 25 агентами.

VIII. Визуализация *in vivo*, способы диагностики и оптимизация иммунотерапии

[0116] В изобретении предложены способы визуализации *in vivo* отложений тау-белка (*например*, отложений, нейрофибриллярных клубков и включений тау) у пациента. Способы осуществляют путем введения пациенту реагента, такого как антитело, которое связывается 30 тау (*например*, мышинные, гуманизированные, химерные или венированные антитела16B5), а затем обнаружения агента после связывания. Предпочтительны антитела, связывающиеся с

эпитопом тау в пределах аминокислот от 24 до 46. В некоторых способах антитело связывается с эпитопом в пределах аминокислот от 25 до 44, или в пределах аминокислот от 30 до 39. Очищающего ответа (clearing response) на вводимые антитела можно избежать или уменьшить при помощи фрагментов антител, в которых не хватает полноразмерной константной области, такой как Fab. В некоторых способах одно и то же антитело может служить в качестве лечашего и диагностического реагента.

[0117] Диагностические реагенты можно вводить в тело пациента путем внутривенной инъекции, или непосредственно в мозг путем внутричерепной инъекции, или просверлив отверстие в черепе. Дозировка реагента должна быть в пределах одних и тех же диапазонов, что и для способов лечения. Обычно реагент помечен, хотя в некоторых способах первичный реагент со сродством к тау не помечен, и применяют вторичный помеченный агент для связывания с первичным реагентом. Выбор метки зависит от средств обнаружения. Например, флуоресцентная метка подходит для оптического обнаружения. Применение парамагнитных меток подходит для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки также могут быть обнаружены при помощи ПЭТ или ОФЭКТ.

[0118] Способы визуализации *in vivo* отложений тау-белка пригодны для диагностики или подтверждения диагноза таупатии, такой как болезнь Альцгеймера, лобно-височной лобарной дегенерации, прогрессирующего надъядерного паралича и болезни Пика, или восприимчивости к такой болезни. Например, способы можно применять на пациентах, у которых присутствуют симптомы деменции. Если у пациента есть аномальные нейрофибриллярные клубки, то, скорее всего, пациент страдает от болезни Альцгеймера. Кроме того, если у пациента есть аномальные включения тау, то в зависимости от расположения включений, пациент может страдать от лобно-височной лобарной дегенерации. Способы также можно применять у бессимптомных пациентов. Наличие аномальных отложений тау-белка указывает восприимчивость к будущим симптомам болезни. Данные способы также пригодны для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение у пациентов, у которых ранее были диагностированы заболевания, ассоциированные с тау.

[0119] Диагноз можно поставить путем сравнения количества, размера и/или интенсивности меченых локусов с соответствующими базовыми значениями. Базовые

значения могут отображать средние уровни в популяции лиц, не имеющих заболевания. Базовые значения также могут представлять собой предыдущие уровни, определенные у данного пациента. Например, базовые значения можно определить у пациента до начала лечения иммунотерапией тау, и в дальнейшем сравнивать измеренные значения с базовыми значениями. Снижение значений относительно базовой линии сигнализирует о положительном ответе на лечение.

[0120] У некоторых пациентов диагноз таупатии можно поставить путем выполнения ПЭТ сканирования. ПЭТ сканирование можно выполнять с применением, например, обычного ПЭТ томографа и вспомогательного оборудования. Сканирование обычно включает одну или более областей мозга, в целом известных как ассоциированные с отложениями тау-белка, и одну или более областей в качестве контроля, в которых обычно почти не присутствуют отложения.

[0121] Сигнал, полученный при ПЭТ сканировании, можно представить в виде многомерного изображения. Многомерные изображения могут быть в двух измерениях, представляющих поперечное сечение мозга, в трех измерениях, представляющих собой трехмерный мозг, или в четырех измерениях, представляющих собой изменения в трехмерном мозге с течением времени. Можно применять цветовые шкалы с различными цветами, указывающими на различные количества метки, и выводение логическим путем отложений тау-белка. Результаты сканирования также могут быть представлены в цифровой форме, с цифрами, относящимися к количеству обнаруженной метки и, следовательно, к количеству отложений тау-белка. Метки, присутствующие в области головного мозга, которая известна как связанная с отложениями, характерными для конкретной таупатии (например, болезни Альцгеймера), можно сравнивать с метками в области, которая известна как не связанная с отложениями, для получения соотношения, указывающего степень отложения в первой из вышеуказанных областей. Для одного и того же лиганда с радиоактивной меткой такие соотношения обеспечивают сопоставимые величины отложений тау-белка и их изменения между разными пациентами.

[0122] В некоторых способах ПЭТ сканирование выполняют одновременно или в тот же визит пациента вместе с МРТ или КТ. МРТ или КТ обеспечивает более анатомическую детализацию мозга, чем ПЭТ. Однако, ПЭТ изображение можно наложить на МРТ или КТ изображения для более точного указания локализации ПЭТ лиганда и вывести логическим

путем нахождения отложений тау относительно анатомических структур мозга. Некоторые приборы могут выполнять одновременно ПЭТ и МРТ или КТ сканирование без изменения положения пациента между сканированием, что облегчает наложение изображений.

5 [0123] Подходящие ПЭТ-лиганды включают радиоактивно меченные антитела согласно изобретению (например, мышинные, гуманизированные, химерные или венеризированные антитела 16B5). Можно применять радиоактивный изотоп, например, C^{11} , N^{13} , O^{15} , F^{18} или I^{123} . Интервал между введением ПЭТ-лиганда и выполнением сканирования может зависеть от ПЭТ-лиганда и в частности от скорости его поглощения и выведения в мозге, и периода полураспада его радиоактивной метки.

10 [0124] ПЭТ сканирование также можно выполнять в качестве профилактической меры у пациентов без симптомов или пациентов, которые имеют симптомы умеренных когнитивных нарушений, но у которых еще не диагностировали таупатию, но которые имеют повышенный риск развития таупатии. Для пациентов без симптомов сканирование особенно полезно для лиц, у которых имеется повышенный риск таупатии из-за семейного анамнеза, генетических
15 или биохимических факторов риска или зрелого возраста. Профилактическое сканирование можно начать, например, у пациентов в возрасте между от 45 до 75 лет. У некоторых пациентов первое сканирование выполняют в возрасте 50 лет.

[0125] Профилактические сканирования можно проводить с интервалом, например, от шести месяцев до десяти лет, предпочтительно между 1-5 годами. У некоторых пациентов
20 профилактические сканирования проводят ежегодно. Если ПЭТ-сканирование, проведенное как профилактическая мера, показало аномально высокие уровни отложений тау-белка, то может быть начата иммунотерапия, а последующие ПЭТ сканирования проводиться у пациентов с диагнозом таупатии. Если ПЭТ-сканирование, проведенное как профилактическая мера, показало нормальные уровни отложений тау-белка, дальнейшие
25 ПЭТ-сканирования можно проводить с интервалом от шести месяцев до 10 лет, и предпочтительно 1-5 лет, как и ранее, или в ответ на появление признаков и симптомов таупатии или при умеренных когнитивных нарушениях. Комбинирование профилактических сканирований с введением тау-направленной иммунотерапии, если обнаружены и когда обнаружены отложения тау-белка выше нормального уровня, то можно уменьшить уровни
30 отложений тау-белка до или близко к нормальным уровням, или по меньшей мере подавить дальнейшее увеличение, и у пациента может не развиваться таупатия в течение более

длительного периода, чем если бы он не делал профилактические сканирования и тау-направленную иммунотерапию (*например*, по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 лет, или до конца жизни пациента).

5 [0126] Нормальные уровни отложений тау-белка можно определить по количеству нейрофибриллярных клубков или включений тау в мозге репрезентативной выборки лиц из
общей популяции, у которых не диагностирована конкретная таупатия (*например*, болезнь
Альцгеймера) и которые рассматриваются, как имеющие повышенный риск развития таких
заболеваний (*например*, репрезентативная выборка лиц без заболеваний, находящихся в
10 возрасте до 50 лет). Альтернативно, нормальный уровень может быть признан у отдельного
пациента, если в соответствии с настоящими способами сигнал ПЭТ в области головного
мозга, в котором известно развитие отложений тау-белка, не отличается (в пределах точности
измерений) от сигнала в области мозга, для которой известно, что такие отложения обычно
не развиваются. Повышенный уровень для отдельного лица можно установить путем
15 сравнения с нормальными уровнями (*например*, за пределами среднего значения и величине
стандартного отклонения), или просто при увеличении сигнала, выходящем за пределы
погрешности эксперимента, в области мозга, ассоциированной с отложениями тау-белка, по
сравнению с областью, которая не связана с отложениями. Для целей сравнения уровней
отложений тау-белка у отдельных лиц и населения, предпочтительно отложения тау-белка
20 должны быть определены в одной и той же области(ях) головного мозга, данные области
включают по меньшей мере одну область, в которой как известно образуются отложения тау-
белка, ассоциированные с конкретной таупатией (*например*, болезнью Альцгеймера).
Пациент, имеющий повышенный уровень отложений тау-белка, является кандидатом для
начала иммунотерапии.

25 [0127] После начала иммунотерапии уменьшение уровня отложений тау-белка можно
первым делом отметить как признак того, что лечение оказывает желаемый эффект.
Наблюдаемое снижение может находиться, например, в диапазоне 1-100%, 1-50% или 1-25%
от базовой величины. Такие эффекты можно обнаружить в одной или более областях
головного мозга, для которых известно образование отложений, или их можно рассчитать из
среднего значения таких областей. Общий эффект лечения можно аппроксимировать путем
30 добавления процентного уменьшения относительно базового уровня к увеличению
отложений тау-белка, которые в противном случае возникли бы у среднего пациента без
лечения.

5 [0128] Поддержание отложений тау-белка на приблизительно постоянном уровне или даже небольшое увеличение отложений тау-белка также может служить признаком ответной реакции на лечение, хотя и неоптимальным ответом. Такие ответы можно сравнивать с динамикой уровней отложений тау-белка у пациентов с конкретной таупатией (*например*, болезнью Альцгеймера), которые не получили лечение, для определения имеет ли иммунотерапия влияние на ингибирование дальнейшего увеличения отложений тау-белка.

10 [0129] Мониторинг изменений в отложениях тау-белка позволяет корректировать иммунотерапию или другой режим лечения в зависимости от ответа на лечение. ПЭТ-мониторинг обеспечивает показания о характере и степени ответа на лечение. Затем можно выполнить определение, следует ли корректировать лечение, и при необходимости лечение можно откорректировать в зависимости от ПЭТ-мониторинга. Таким образом, ПЭТ-мониторинг позволяет регулировать тау-направленную иммунотерапию или другой режим лечения до получения детектируемого ответа от других биомаркеров, МРТ или умозаключений. Существенное изменение означает, что сравнение значения параметра после 15 лечения по отношению базовому обеспечивает некоторые доказательства того, что лечение привело или не привело к положительному эффекту. В некоторых случаях изменение значений параметра у пациента обеспечивает доказательства того, что лечение привело или не привело к положительному эффекту. В других случаях изменение значений у пациента, если таковые имеются, сравнивают с изменением значений, если таковые имеются, в 20 контрольной репрезентативной популяции пациентов, не подвергавшихся иммунотерапии. Разница между ответом у конкретного пациента и нормальным ответом у контрольного пациента (*например*, среднее значение плюс величина стандартного отклонения) также может представлять доказательства того, что режим иммунотерапии привел или не привел к положительному эффекту у пациента.

25 [0130] У некоторых пациентов мониторинг выявляет обнаруживаемое уменьшение отложений тау-белка, но уровень отложений тау-белка остается выше нормы. У таких пациентов, если отсутствуют неприемлемые побочные эффекты, можно продолжать существующий режим лечения или даже увеличивать частоту введения и/или дозу, если уже не достигнута максимально рекомендуемая доза.

30 [0131] Если мониторинг показывает, что уровни отложений тау-белка у пациента уже уменьшились до нормальных или почти нормальных уровней отложений тау-белка, режим

иммунотерапии можно отрегулировать от индукции (*т.е.*, который снижает уровень отложений тау-белка) до поддержания (*т.е.*, который поддерживает отложения тау-белка на приблизительно постоянном уровне). Такой режим может зависеть от снижения дозы и/или частоты введения иммунотерапии.

5 [0132] У других пациентов мониторинг может показать, что иммунотерапия оказывает некоторый положительный эффект, но неоптимальный эффект. Оптимальный эффект можно определить как процент снижения уровня отложений тау-белка в верхней половине или квартили изменений в отложениях тау-белка (измеряется или рассчитывается по всему мозгу
10 белка), наблюдаемый в репрезентативной выборке пациентов с таупатией, которых подвергают иммунотерапии в данный момент времени после начала терапии. Пациента, у которого наблюдается меньшее сокращение, или пациента, у которого отложения тау-белка остаются постоянным или даже увеличиваются, но в меньшей степени, чем ожидалось при
15 отсутствии иммунотерапии (*например*, как получено для контрольной группы пациентов, которым не вводили иммунотерапию), можно классифицировать как имеющих положительный, но неоптимальный ответ. Для таких пациентов необязательно можно корректировать режим, при котором увеличивается доза и/или частота введения агента.

[0133] У некоторых пациентов отложения тау-белка могут увеличиваться в аналогичной или большей степени до отложений тау у пациентов, не получающих иммунотерапию. Если
20 такое увеличение сохраняется в течение времени, такого как 18 месяцев или 2 года, даже после какого-либо увеличения частоты или дозы агентов, при необходимости можно прекратить иммунотерапию в пользу других процедур.

[0134] Вышеприведенное описание диагностики, мониторинга и корректировки лечения таупатий в значительной степени сосредоточено на применении ПЭТ-сканирования.
25 Однако, для осуществления таких методов вместо ПЭТ-сканирования можно применять любой другой способ визуализации и/или измерения отложений тау-белка, пригодный для использования антител тау согласно изобретению (*например*, мышинных, гуманизированных, химерных или венированных антител 16B5).

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Получение антитела 16B5

[0135] Пан антитело16B5, которое распознает, фосфорилирован ли тау ли нет, получали посредством очищенного тау и выбрали на основании его свойств захвата с высокой аффинностью при помощи ИФА анализа.

ПРИМЕР 2. Клонирование и секвенирование антитела 16B5

[0136] РНК экстрагировали из осажденных клеток, экспрессирующих антитела 16B5 с применением Trizol LS (Invitrogen). Концентрации РНК измеряли при помощи набора Quant-IT (Invitrogen).

10 [0137] Быструю амплификацию концов кДНК 5'-RACE применяли для амплификации 5'-конца мРНК IgG с использованием набора Smart RACE (Clontech). Для реакции с обратной транскрипцией использовали примерно 1 мкг РНК, и далее амплифицировали пул кДНК с применением универсального праймера, поставляемого в наборе Smart RACE, а также ген-специфичных праймеров (GSP), сконструированных в ExonBIO.

15 [0138] Последовательности праймеров:

Универсальный праймер: СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГС (SEQ ID №: 7)

GSP:

IgG1 и IgG2a: СТС ААТ ТТТ СТТ ГТС САС СТТ ГГТ ГС (SEQ ID №: 8)

IgG2b: СТС ААГ ТТТ ТТТ ГТС САС СГТ ГГТ ГС (SEQ ID №: 9)

20 [0139] ПЦР-продукты очищали в геле и клонировали в тупом векторе pSUPER (Adexon, www.adexonbiotech.com). Для тяжелой цепи подготавливали и секвенировали 15 колоний. Для легкой цепи выполняли метод молекулярных колоний, чтобы отличить эндогенную аберрантную легкую цепь, и секвенировали только клоны, которые не были амплифицированы в методе молекулярных колоний. Результаты секвенирования

25 анализовали на векторе NTI. Адаптер и праймеры GSP отмечали на карте. Области между адаптером и последовательностями GSP являются последовательностями тяжелой цепи IgG, которые включают лидер, сигнальный пептид и V-область, и часть константной области. На карте отмечали открытую рамку считывания (ORF).

ПРИМЕР 3. Картирование эпитопов антитела 16B5

[0140] Идентификация эпитопа путем анализа пептидных фрагментов. Последовательность тау человека с 4 повторами связывания с микротрубочками и без N-концевых вставок, и содержащую мутацию P301L (гТau), экспрессировали в *E.coli* и очищали. Данная форма тау имела последовательность SEQ ID №:3 с заменой лейцина на пролин в положении 243 (которая соответствует P301L с применением системы нумерации на основе самой длинной изоформы тау). Ферментное расщепление 200 мкг тау проводили с одной из четырех различных протеаз: трипсином (который расщепляет по карбоксильным концам аргинина и лизина), химотрипсин (который в первую очередь который расщепляет по карбоксильным концам тирозина, триптофана, фенилаланина и лейцина), LysC (который расщепляет по карбоксильным концам лизина) или GluC (который расщепляет после остатков глутамата и редко после остатков аспартата). Все протеазы были получены от Thermo Scientific, а гидролиз проводили в течение 16 ч при 37°C. Полученные пептидные фрагменты инкубировали с 10 мкг 16B5 и осаждали при помощи магнитных шариков с белком G (NEB). Осадок тщательно промывали в ФСБ, содержащем 300 mM NaCl и 0,5% NP-40, затем элюировали 1 M NaCl в 100 mM глицине, pH 2,8. Элюаты сушили под вакуумом и ресуспендировали в 0,1% трифторуксусной кислоте (ТФУ). Ресуспендированные элюаты наносили на 4,6x50 мм колонку C18, затем фракционировали при помощи ВЭЖХ (Agilent 1260 Infinity system) с применением линейного градиента ацетонитрила с 0,075% ТФУ. Фракции пиков собирали, сушили и ресуспендировали в дистиллированной воде. Массы пептидов и идентичность определяли посредством масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF. Пик, соответствующий остаткам 25-44 последовательности SEQ ID №:1, был идентифицирован в масс-спектре после LysC. Пики, соответствующие остаткам 25-44 последовательности SEQ ID №:1 и 24-44, были идентифицированы в масс-спектре после трипсина. Не было получено сигнала после расщепления химотрипсином и GluC, предполагается, что некоторые эпитопы могли содержать остаток 29 последовательности SEQ ID №:1 и/или остаток 37 последовательности SEQ ID №:1.

[0141] Идентификация эпитопа путем мутационного анализа. Используя результаты, полученные путем анализа пептидных фрагментов (описанного выше), проводили делеционный мутагенез гТau путем амплификации всей плазмиды с применением стандартных методов молекулярной биологии. Белок экспрессировали в небольших объемах бактериальной культуры, и равные объемы очищенного бактериального лизата подвергали

электрофорезу, блоттингу и окрашиванию антителами 16B5. Для контроля нанесения образца применяли антитело Tau46 со специфичностью к С-концевой области тау (С-концевому эпитопу) для окрашивания дубликатов блотов. Оба антитела применяли в концентрации 0,2 мкг/мл. Изображения получали при помощи флуоресцентного сканера Licor Odyssey. Данным способом получали и анализировали следующие делеционные мутанты тау: Δ5-24, Δ23-32, Δ25-44, Δ30-39 и Δ37-46. Как показано на фигурах 1 и 2, делеционные мутанты тау Δ25-44 и Δ30-39 не обнаружены посредством антител 16B5, предоставляя доказательства того, что эпитоп, распознаваемый 16B5, лежит в пределах этих остатков. Делеционный мутант тау Δ37-46 лишь незначительно определялся посредством 16B5, предоставляя доказательства того, что некоторые из остатков в 37-46 (*например*, остаток 37) могут играть роль в связывании 16B5 с тау. Антитела 16B5 окрашивали делеционный мутант тау Δ23-32 в меньшей степени, чем Δ5-24, и в большей степени, чем делеционные мутанты Δ25-44 и Δ30-39, предоставляя доказательства того, что 16B5 также может связываться с пептидом, содержащим остатки 33-36, 30-36, 33-37, 30-37 или 33-39. В целом, данные, полученные от делеционных мутантов тау, позволяют предположить, что эпитоп, распознаваемый 16B5, может содержать некоторые или все остатки 23-32 последовательности SEQ ID №:1 и некоторые или все из остатков 37-46 последовательности SEQ ID №:1. Например, 16B5 может распознавать эпитоп в пределах остатков 32-38 или 28-41 последовательности SEQ ID №:1.

20 **[0142]** Идентификация эпитопа путем аланинового сканирования. Одиночные остатки в области тау, охватывающие остатки 30-42, затем заменяли посредством мутации на аланин с помощью ПЦР мутагенеза. Мутантные белки экспрессировали, и лизаты разделяли посредством электрофореза и блоттировали либо с антителом 16B5, либо антителом Tau46, как описано выше. Результаты данного анализа представлены на фигуре 3.

25 Проанализированные конкретные точечные мутанты, включая T30A, M31A, H32A, Q33A, D34A, Q35A, E36A, G37A, D38A, T39A, D40A, A41L и G42A, перечислены наверху блотов. Остатки, представляющие особый интерес, обведены рамкой на каждом блоте. Обнаруживаемое связывание 16B5 полностью устранено мутантом тау Q33A и существенно уменьшено мутантом тау G37A, предоставляя доказательства того, что остаток 33, и в

30 меньшей степени остаток 37, могут быть важными компонентами эпитопа, узнаваемого 16B5. Другие остатки могут быть важными компонентами эпитопа, узнаваемого 16B5 при Viacore анализе.

ПРИМЕР 4. Пассивная иммунизация в hTau.P301L трансгенной мышшиной модели таупатии

[0143] Иммунизация. В данном исследовании применяли 3-месячных самок мышшей hTau.P301L-Tg с фоновым генотипом FVB/N. Введение 10 мг/кг тестируемых и контрольных антител проводили внутривбрюшинно один раз в неделю. Продолжительность обработки составила около 5 месяцев. После 23 инъекций исследование завершали умерщвлением мышшей. В таблице 1 описаны тестируемые и контрольные антитела, которые вводили в данном исследовании.

Таблица 1
Схема дозирования

	Группа К	Группа М
Антитело	16B5	6F10
Специфичность связывания	В пределах 23-46 (см. пример 3)	Неиммунный контроль изотипа IgG1
N	22	22
Обработка	N2	N3
Доза	10 мг/кг еженедельно	10 мг/кг еженедельно
Объем дозы	1,724 мл/кг	2,381 мл/кг

[0144] В трансгенных мышшиных моделях таупатии наблюдается преждевременная смерть как клиническое проявление генетического заболевания. В конкретный модели, применяемой в данном исследовании, гиперфосфорилированный тау образовывался в возрасте от 6 месяцев, хотя и с высокой изменчивостью возникновения. Мыши также страдали двигательными дефектами, такими как сдавливание задних конечностей (hind limb clasping) и снижение общей подвижности, и преждевременно умирали в возрасте 8-11 месяцев в (reMYND неопубликованные данные, Terwel *et al.*, 2005). Мышей, у которых развивались симптомы терминальной стадии заболевания, характеризующиеся наличием клинического проявления сдавливания (clasping phenotype) и потерей массы, умерщвляли. Неожиданно большое количество мышшей преждевременно погибли без присутствия данных симптомов. Причина смерти в таких случаях, как полагают, не имела отношения к поздней стадии таупатии или тестируемому антителу, а вместо этого, как полагают, была связана с инбредным фоновым генотипом FVB/N.

[0145] В таблице 2 представлен обзор общей выживаемости всех мышей в течение исследования.

Таблица 2

Выживаемость во время обработки (все причины смерти)

		№ в начале исследования	№ выживших перед умерщвлением	% выживаемости
Группа К	N2	22(23)*	11	50(47)
Группа М	N3	22	13	59

* Одну мышь в группе К необходимо было заменить в начале исследования. Данные можно проанализировать с или без замененной мыши.

5 [0146] После умерщвления мышей препарировали, и гомогенизировали ствол головного мозга и средний мозг с применением механического гомогенизатора поттер-типа (VOS 14 S40, частота 750 об/мин; VWR) в 10 объемах (на единицу массы) охлажденного на льду буфера трис-протеиназы-фосфатазы-ингибитора (TPPI-буфера), содержащего: 20 мМ Трис-НCl (рН 8,1); 150 мМ NaCl; 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, Merck); 1 мМ этиленгликольтетрауксусной кислоты (ЭГТА, Sigma-Aldrich); 5 мМ пирофосфата натрия (Sigma); 30 мМ фторида натрия (Sigma-Aldrich); 1 мМ ФМСФ (Sigma); 2 мМ ванадата натрия (Sigma); 10 мМ 1,10-орто-фенантролинмоногидрата (Sigma-Aldrich); 5 мкг/мл соевого ингибитора трипсина; 5 мкг/мл пепстатина; и смесь ингибиторов протеаз (CPI, Рош Диагностика ГмБХ, Германия). Фиксированные объемы 140 мкл и 100 мкл гомогенатов
10 ствола головного мозга и среднего мозга (TotH), соответственно, (примерно половину от общего объема) центрифугировали при 136000xg, в течение 60 мин при 4°C (ротор TLA-55, ультрацентрифуга OptimaTMTLX, Beckman Coulter) для получения трис-растворимой фракции (SF), и остатки общих гомогенатов хранили при -80°C. Из-за ограниченного числа держателей центрифуги (N=12), образцы рандомизировали для уравнивания центрифуги
15 и разделяли на различные группы обработки в течение разных сеансов центрифугирования.

[0147] Супернатант (S1, также называемый "растворимой фракцией" или "SF") отделяли от осадка (P1), аликвотировали и хранили при -80°C. Осадок P1 солюбилизировали в 10 объемах (на единицу массы) раствора с высоким содержанием соли (0,85 М NaCl, содержащего TPPI-буфер) и центрифугировали при 20000xg в течение 30 мин при 4°C. Полученный осадок (P2)
20 с высоким содержанием соли хранили при -80°C. Супернатант (S2) переводили в 1% саркозил, используя одну десятую 10% саркозила, и инкубировали при комнатной

температуре в течение 60 мин во вращающемся шейкере-переворачивателе (top-over-top rotary tumbler), затем центрифугировали при 136000xg в течение 60 мин при 4°C. Супернатант (S3), растворимый в саркозиле, хранили при -80°C и осадок, нерастворимый в саркозиле (P3, также называемый "нерастворимой фракцией" или "IF") ресуспендировали в 5 30 мкл TPPI-буфера и аликвотировали. Общий гомогенат (TotH), трис-растворимые (SF) и нерастворимые в саркозиле (IF) фракции ствола головного мозга, полученные в соответствии с протоколом фракционирования, описанным выше, использовали для последующих анализов посредством электрофореза в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинга.

[0148] Электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг. Для применения 10 обычной SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга, образцы денатурировали и восстанавливали путем инкубации при 95°C в течение 10 мин, затем разделяли в 7,5% Трис-НСl гелях (Criterion XT Precast Gel, 26-карманов, 15 мкл, 1,0 мм; Biorad). После сухого электропереноса (iBlot™ Invitrogen) на ПВДФ-мембраны (iBlot™ Gel Transfer Stacks, ПВДФ, стандартный размер, Invitrogen), мембраны промывали в 0,4% ПФА в течение 30 мин, а затем промывали в Трис-15 солевом буфере. Далее мембраны инкубировали в течение 1 часа в Трис-солевом буфере (TBS, pH 7,6), содержащем 5% (масс./об.) обезжиренного сухого молока и 0,1% (об./об.) твин-20. Блоты инкубировали с различными первичными антителами к тау в течение ночи, при рабочих концентрациях, представленных в таблице 3. После промывки и инкубации с 20 анти-мышинными или анти-кроличими HRP-конъюгированными вторичными антителами (антитела козы к IgG мыши или антитела козы к IgG кролика, DAKO), блоты обрабатывали при помощи системы обнаружения ECL (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, продукт 34096, Thermo Scientific). Изображения записывали в цифровом виде (VisionWorks Acquisition, UVP) с различным временем экспозиции, и для анализа блотов применяли специализированное программное обеспечение (VisionWorks Analysis, UVP). Для 25 сравнения, внутренний стандарт для геля запускали с аликвотами четырех фракций, нанесенных на каждый гель для сравнения. Первичные моноклональные антитела к тау, применяемые для обнаружения, включали AT100 (фосфо-тау, Thermo Scientific; разведение 1:250), AT8 (фосфо-тау, Thermo Scientific; разведение 1:500), HT7 (пан тау, Pierce; разведение 1:1000) и 1F5 (эпитоп, неизвестный для испытательной лаборатории, Neotop, разведение 30 3:500). Блоты повторно исследовали с антителами к ГАФД (Abcam 9485; разведении 1: 2500) в качестве контроля нагрузки. Пан-тау антитела не являются специфичными для фосфо-тау.

Таблица 3

Краткое описание антител, применяемых для биохимического анализа

mAb	Поставщик	Специфичность (человек)	Стоковая концентрация	Рабочая концентрация
AT100	Thermo Scientific	Фосфо-PHF-тау pSer212/Thr214	200 мкг/мл	0,8 мкг/мл
AT 8	Thermo Scientific	Фосфо-PHF-тау pSer202/Thr205	200 мкг/мл	0,4 мкг/мл
HT7	Pierce	между остатками 159 и 163	200 мкг/мл	0,2 мкг/мл
1F5*	Neotope	pS ⁴⁰⁴	1 мг/мл	6 мкг/мл
ГАФД	Abcam	Человек	1 мг/мл	0,4 мкг/мл

*изотип IgG2b, гибридома JH131-1F5.4.1, лот № NB-0081

[0149] Как показано на фигуре 4, статистически значимое уменьшение количества тау наблюдалось в нерастворимых в саркозиле фракциях ствола головного мозга у животных, обработанных антителом 16B5, по сравнению с животными, обработанными контрольным антителом 6F10. Статистическую значимость оценивали с помощью t-теста Стьюдента, $p < 0,05$. Данное уменьшение наблюдалось для обоих фосфо-тау специфических антител (AT8, верхнее левое изображение; AT100, нижнее левое изображение; 1F5, верхнее правое изображение) и пан-тау антител (HT7, нижнее правое изображение). Вестерн-блоты общего гомогената также указывают на значительное уменьшение отношения фосфо-тау к общему тау у животных, обработанных 16B5, по сравнению с контрольными животными, обработанными антителами 6F10, при детектировании с помощью фосфо-специфических антител. *Смотрите* фигуру 5, левое изображение (на котором показан сигнал, обнаруженный посредством антитела к фосфо-тау AT8, разделенный на сигнал, обнаруженный посредством антитела пан-тау HT7). В противоположность этому, не было никаких существенных изменений в соотношении общего тау к уровням ГАФД в общих гомогенатах от животных, обработанных 16B5, по сравнению с контрольными животными, обработанными антителами 6F10. *Смотрите* фигуру 5, правое изображение (на котором показан сигнал, обнаруженный посредством антитела пан-тау HT7, разделенный на сигнал, обнаруженный посредством

антитела ГАФД). Эти данные предоставляют доказательства того, что уровень фосфо-тау, но не общего тау, снижен в гомогенатах.

[0150] Гистологический анализ. Иммуногистохимический анализ с применением антител к фосфо-тау проводили в субталамическом ядре, прилегающем к неопределенной зоне (STH/ZI), и в промежуточном ядре мозжечка, передней и задней части, прилегающей к боковому ядру мозжечка (IntA/P/LAT). Сагиттальные вибраторные срезы (40 мкм) до использования хранили в ФСБ с 0,1% азида натрия при 4 °С. Восемь срезов на мышь в области брегмы окрашивали при свободном плавании с помощью моноклональных антител AT8, AT100 или 1F5. Срезы выбирали для окрашивания при помощи указанными антителами, как указано в таблице 4 ниже. Срезы от всех животных, выбранные для конкретного окрашивания, рандомизировали для окрашивания и количественно оценивали "вслепую".

[0151] Свободно плавающие срезы инкубировали в Netwells™. Затем срезы дважды промывали ФСБ и инкубировали в течение 20 минут в 1,5% перекиси водорода в ФСБ и метанола (1: 1) для устранения активности эндогенной пероксидазы. После промывки срезов три раза в ФСБ, содержащем 0,1% Тритон X100 (ФСБТ), срезы блокировали в течение 30 мин в 10% фетальной телячьей сыворотке (FCS) в ФСБТ с последующим инкубированием в течение ночи с первичными антителами AT8, AT100 (Thermo scientific), используя концентрации 0,4 мкг/мл и 0,05 мкг/мл, соответственно, в ФСБТ с 10% FCS. После промывки срезы инкубировали с вторичными антителами козы к антителам мыши, меченными пероксидазой (GAMPO) (DAKO, 1/500 в ФСБТ, 10% FCS), и сигнал получали с использованием 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорид (ДАБ, 1 таблетка на 10 мл Трис-НСl с 3 мкл H₂O₂ на 10 мл). Срезы докрашивали гематоксилином Майера, обезвоживали в пять этапов (50, 70, 95 и 2x100%) в этаноле и ксилоле (Merck Eurolab) и помещали в Depex (среда для заливки Depex, BDH Laboratory).

Таблица 4

Краткое описание антител, применяемых для иммуногистохимического анализа

mAb	Поставщик	Специфичность	Хозяин	Стоковая концентрация	Рабочая концентрация
AT8	Thermo Scientific	Человек	Мышь	200 мкг/мл	0,4 мкг/мл
AT100	Thermo Scientific	Человек	Мышь	200 мкг/мл	0,05 мкг/мл

5 [0152] Изображения получали при помощи микроскопа Olympus BX41, оснащенного камерой Color view II Olympus, и анализировали при помощи компьютера с применением программного обеспечения AnalySIS Five – Cell[^]D. Интенсивность света и настройки конденсора для микроскопа сохраняли постоянным в течение всего процесса получения изображения. Все полученные изображения подвергали одинаковым компьютерным обработкам, чтобы минимизировать предвзятое отношение исследователя. Пороговое представление яркости изображения срезов (density slice thresholding) равномерно применяли в течение всего анализа.

10 [0153] Область, представляющую интерес, как определено ниже, выбирали для автоматического количественного определения сигнала(ов) при окрашивании. Субталамическое ядро и неопределенная зона были очерчены ножкой мозга вентрально и белым веществом дорсально, соответственно, а также на основе различий в плотности клеток (сагиттальный разрез мозжечка, брегма 1,32-1,92). Промежуточное ядро мозжечка, передняя и задняя части, и боковое ядро мозжечка были очерчены белым веществом и изменением 15 плотности клеток и τρίты желудочком (сагиттальный разрез мозжечка, брегма 1,92-2,64 для LAT и 0,84-1,8 для IntA/P). Для каждого окрашивания, 6 срезов головного мозга, содержащих STN/ZI, и 16 срезов, содержащих IntA/P/LAT, на мышь были включены в анализ.

20 [0154] Как показано на фиг. 6, количество фосфо-тау, обнаруженное в ядрах мозжечка и субталамической области животных, обработанных антителами 16B5, было значимо ниже по сравнению с количеством фосфо-тау, обнаруженном в тех же структурах у контрольных животных, обработанных антителами 6F10. Статистическую значимость оценивали с помощью t-теста Стьюдента, $p < 0,05$.

ПРИМЕР 5. Гуманизация 16B5

25 [0155] Анализ последовательности показал, что антитело 16B5 имеет каппа-вариабельный домен (Vk), имеющий последовательность SEQ ID №:16, которая принадлежит подгруппе мыши 1 по Кабату, и соответствует подгруппе человека 4 по Кабату. CDR по Кабату подчеркнуты. Вариабельный тяжелый домен (Vh) антитела 16B5 имеет последовательность SEQ ID №:10, которая принадлежит подгруппе мыши 2b по Кабату, и соответствует подгруппе человека 1 по Кабату (Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological 30 Interest, Fifth Edition; NIH Publication No. 91-3242). CDR по Кабату подчеркнуты.

[0156] Домен 16B5 Vk содержит 17-й остаток последовательности CDR-L1 (KSSQSLLNSRTRKNYLA, SEQ ID №: 17), 7-й остаток последовательности CDR-L2 (WASTRES, SEQ ID №: 18) и 8-й остаток последовательности CDR-L3 (KQSYTLRT, SEQ ID №: 19). Последовательность CDR-L1 принадлежит к каноническому классу 3, и последовательности CDR-L2 и CDR-L3 принадлежат к каноническому классу 1 (Martin & Thornton (1996), J. Mol. Biol. 263:800-15).

[0157] Домен 16B5 Vh содержит 5-й остаток последовательности CDR-H1 (YHGMD, SEQ ID №: 11) на основе нумерации Кабата или 10-й остаток последовательности CDR-H1 (GYPFTYHGMD, SEQ ID №: 24) на основе комбинированной нумерации Кабата и Чотиа, 17-й остаток последовательности CDR-H2 (WINTYSGVPTYADDFKG, SEQ ID №: 12), и 8-й остаток последовательности CDR-H3 (RRDFTMDF, SEQ ID №: 13). Последовательность CDR-H1 принадлежит к каноническому классу 1 и последовательность CDR-H2 принадлежит к каноническому классу 2 (Martin & Thornton (1996), J. Mol. Biol. 263:800-15). Последовательность CDR-H3 не имеет канонического класса, но, вероятно, основания, создающие изломы (kinked base), в соответствии с правилами Shirai et al. (1999), FEBS Lett. 455:188-97.

[0158] Остатки в зоне контакта между доменами Vk и Vh представляют собой обычные остатки для данных позиций у мышей.

[0159] Проводили поиск среди белковых последовательностей в базе данных PDB (Deshpande et al. (2011), J. Virol. 85:1820-33), чтобы найти структуры, которые обеспечивали бы грубую структурную модель антитела 16B5. Структуру Fab-фрагмента антитела Te33 к холерному токсину (pdb код 1ZEA_H) использовали для VL с разрешением 1,78 Å. Оно сохранило одинаковую каноническую структуру петель с 16B5. Кристаллическую структуру Fab в Dsbb-Fab комплексе (pdb код 2ZUQ_B) использовали для моделирования домена VH из 16B5. Его расшифровали с разрешением 3,3 Å и он содержал одинаковые канонические структуры для CDR-H1 и CDR-H2, а также имел одинаковую длину CDR-H3 с основаниями, создающими изломы. Программу BioLuminate применяли для моделирования грубой структуры 16B5 Fv.

[0160] Поиск по избыточной базе данных последовательностей белков из NCBI с CDR"X" 16B5 Fv последовательностью позволил выбрать подходящие каркасные участки человека, в которые встроили CDR мыши. Для Vk выбрана каппа легкая цепь человека с

учетным номером ACJ71718.pro в NCBI (SEQ ID №: 20). Данная последовательность человека каппа легкой цепи имеет те же канонические классы для CDR-L2 и L3. Для Vh выбран Ig тяжелой цепи BAC02002.1 человека (SEQ ID №: 14). Он разделяет каноническую форму 16B5 CDR-H1 и H2, и H3 представляет собой 8 остатков в длину с прогнозируемыми основаниями, создающими изломы.

[0161] Конструкция гуманизованной тяжелой цепи и легкой цепи и обратные мутации на основе данных каркасных участков человека приведены в таблицах 5 и 6, соответственно.

[0162] Разработана гуманизованная 16B5 переменная тяжелая цепь (H1), имеющая последовательность SEQ ID №: 15. Конструкция включает три обратные мутации: R13K; V48M; и Y98F. К в положении 13 выбран потому, что он чаще, встречается, чем R у людей. М в положении 48 выбран потому, что он чаще, встречается, чем V у людей. F в положении 98 выбран потому, что он расположен в зоне контакта, что делает его желательным для сохранения остатка мыши.

[0163] Разработаны три гуманизованные 16B5 переменные последовательности легкой цепи:

Версия 1 (L1) имеет последовательность SEQ ID №: 21 и содержит три обратные мутации: D1N; M4L; и Y36F. N в положении 1 выбран потому, что образует потенциальную водородную связь с N61 в HCDR2. L в положении 4 выбран потому, что контактирует с K96, Q97 и S98 в LCDR3; он также контактирует с F104, контактный остаток (interface residue). F в положении 36 выбран потому, что Y может образовывать водородную связь с D106 в HCDR3, в то время как F не может. Водородная связь могла бы создавать дополнительное взаимодействие, которое могло повлиять на функцию HCDR3, и таким образом, ее предпочтительно избегать.

[0164] Версия 2 (L2) имеет последовательность SEQ ID №: 22 и содержит четыре обратные мутации: D1N; M4L; Y36F; и P43S. Обоснования для D1N, M4L и Y36F такие же, как для версии 1. S в положении 43 выбран потому, что S образует водородную связь с Q110 в VH, который близок к HCDR3.

[0165] Версия 3 (L3) имеет последовательность SEQ ID №: 23 содержит три обратные мутации: M4L; Y36F; и P43S. Обоснования для каждой из этих мутаций такое же, как для версий 1 и 2.

Таблица 5

Последовательности для гуманизации тяжелой цепи 16B5

Остаток по Кабату №	Линейный остаток №	FR или CDR	Родительское моноклональное антитело мыши SEQ ID №:10	Hu VH акцептор FR B2 SEQ ID №:14	Гуманизованная конструкция v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID №:15
1	1	Fr1	Q	Q	Q
2	2	Fr1	I	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L
5	5	Fr1	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G
9	9	Fr1	P	S	S
10	10	Fr1	E	E	E
11	11	Fr1	L	L	L
12	12	Fr1	K	K	K
13	13	Fr1	K	R	K
14	14	Fr1	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G
16	16	Fr1	E	A	A
17	17	Fr1	T	S	S
18	18	Fr1	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K
20	20	Fr1	I	V	V
21	21	Fr1	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S
26	26	Fr1	G	G	G
27	27	Fr1	Y	Y	Y
28	28	Fr1	P	S	T
29	29	Fr1	F	F	F
30	30	Fr1	T	T	T
31	31	CDR-H1	Y	S	Y
32	32	CDR-H1	H	Y	H
33	33	CDR-H1	G	A	G

Таблица 5

Последовательности для гуманизации тяжелой цепи 16B5

Остаток по Кабату №	Линейный остаток №	FR или CDR	Родительское моноклональное антитело мыши SEQ ID №:10	Hu VH акцептор FR B2 SEQ ID №:14	Гуманизованная конструкция v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID №:15
34	34	CDR-H1	M	V	M
35	35	CDR-H1	D	N	D
35A		CDR-H1			
35B		CDR-H1			
36	36	Fr2	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q
40	40	Fr2	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P
42	42	Fr2	W	G	G
43	43	Fr2	G	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W
48	48	Fr2	M	V	M
49	49	Fr2	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	I	I
52	52	CDR-H2	N	N	N
52A	53	CDR-H2	T	T	T
52B	54	CDR-H2	Y	N	Y
52C	55	CDR-H2	S	T	S
52D	56	CDR-H2	G	G	G
52E	57	CDR-H2	V	N	V
52F	58	CDR-H2	P	P	P
53	59	CDR-H2	T	T	T
54	60	CDR-H2	Y	Y	Y
55	61	CDR-H2	A	A	A
56	62	CDR-H2	D	Q	D
57	63	CDR-H2	D	G	D
58	64	CDR-H2	F	F	F

Таблица 5

Последовательности для гуманизации тяжелой цепи 16B5

Остаток по Кабату №	Линейный остаток №	FR или CDR	Родительское моноклональное антитело мыши SEQ ID №:10	Hu VH акцептор FR B2 SEQ ID №:14	Гуманизованная конструкция v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID №:15
59	65	CDR-H2	K	T	K
60	66	CDR-H2	G	G	G
66	67	Fr3	R	R	R
67	68	Fr3	F	F	F
68	69	Fr3	A	V	V
69	70	Fr3	F	F	F
70	71	Fr3	S	S	S
71	72	Fr3	L	L	L
72	73	Fr3	E	D	D
73	74	Fr3	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S
75	76	Fr3	V	V	V
76	77	Fr3	G	S	S
77	78	Fr3	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A
79	83	Fr3	Y	Y	Y
80	84	Fr3	L	L	L
81	85	Fr3	Q	Q	Q
82	86	Fr3	I	I	I
82A	87	Fr3	N	S	S
82B	88	Fr3	N	S	S
82C	89	Fr3	L	L	L
83	90	Fr3	K	K	K
84	91	Fr3	N	A	A
85	92	Fr3	E	A	E
86	93	Fr3	D	D	D
87	94	Fr3	T	T	T
88	95	Fr3	A	A	A
89	96	Fr3	T	V	V
90	97	Fr3	Y	Y	Y
91	98	Fr3	F	Y	F
92	99	Fr3	C	C	C
93	100	Fr3	A	A	A

Таблица 5

Последовательности для гуманизации тяжелой цепи 16B5

Остаток по Кабату №	Линейный остаток №	FR или CDR	Родительское моноклональное антитело мыши SEQ ID №:10	Hu VH акцептор FR B2 SEQ ID №:14	Гуманизованная конструкция v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID №:15
94	101	Fr3	R	R	R
95	102	CDR-H3	R	A	R
96	103	CDR-H3	R	R	R
97	104	CDR-H3	D	G	D
98	105	CDR-H3	F	Q	F
99	106	CDR-H3	T	N	T
100	107	CDR-H3	M	G	M
100A		CDR-H3		M	
100B					
100C					
100D					
100E					
100F					
100G					
100H					
100I					
100J					
100K					
101	108	CDR-H3	D	D	D
102	109	CDR-H3	F	V	F
103	110	Fr4	W	W	W
104	111	Fr4	G	G	G
105	112	Fr4	Q	Q	Q
106	113	Fr4	G	G	G
107	114	Fr4	T	T	T
108	115	Fr4	S	T	T
109	116	Fr4	V	V	V
110	117	Fr4	T	T	T
111	118	Fr4	V	V	V
112	119	Fr4	S	S	S
113	120	Fr4	S	S	S

Таблица 6

Последовательности для гуманизации переменных областей легкой цепи 16B5

Остаток по Кабату №	Линейный остаток №	FR или CDR	Родительское моноклональное антитело SEQ ID №:16 мыши	Hu VL акцептор FR SEQ ID №:20	Гуманизованная конструкция v1 (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID №:21	Гуманизованная конструкция v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID №:22	Гуманизованная конструкция v3 (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID №:23
1	1	Fr1	N	D	N	N	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	L	M	L	L	L
5	5	Fr1	S	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	S	D	D	D	D
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	A	A	A	A	A
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	S	S	S	S
15	15	Fr1	P	L	L	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	E	E	E	E	E
18	18	Fr1	K	R	R	R	R
19	19	Fr1	V	A	A	A	A
20	20	Fr1	T	T	T	T	T
21	21	Fr1	M	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	N	N	N	N
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	V	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L
27D	31	CDR-L1	N	Y	N	N	N
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S
27F	33	CDR-L1	R	S	R	R	R

Таблица 5

Последовательности для гуманизации тяжелой цепи 16B5

Остаток по Кабату №	Линейный остаток №	FR или CDR	Родительское моноклональное антитело мыши SEQ ID №:10	Hu VH акцептор FR B2 SEQ ID №:14	Гуманизованная конструкция v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID №:15	
28	34	CDR-L1	T	N	T	T
29	35	CDR-L1	R	N	R	R
30	36	CDR-L1	K	K	K	K
31	37	CDR-L1	N	N	N	N
32	38	CDR-L1	Y	Y	Y	Y
33	39	CDR-L1	L	L	L	L
34	40	CDR-L1	A	A	A	A
35	41	Fr2	W	W	W	W
36	42	Fr2	F	Y	F	F
37	43	Fr2	Q	Q	Q	Q
38	44	Fr2	Q	Q	Q	Q
39	45	Fr2	K	K	K	K
40	46	Fr2	P	P	P	P
41	47	Fr2	G	G	G	G
42	48	Fr2	Q	Q	Q	Q
43	49	Fr2	S	P	S	S
44	50	Fr2	P	P	P	P
45	51	Fr2	K	K	K	K
46	52	Fr2	L	L	L	L
47	53	Fr2	L	L	L	L
48	54	Fr2	I	I	I	I
49	55	Fr2	Y	Y	Y	Y
50	56	CDR-L2	W	W	W	W
51	57	CDR-L2	A	A	A	A
52	58	CDR-L2	S	S	S	S
53	59	CDR-L2	T	T	T	T
54	60	CDR-L2	R	R	R	R
55	61	CDR-L2	E	E	E	E
56	62	CDR-L2	S	S	S	S
57	63	Fr3	G	G	G	G
58	64	Fr3	V	V	V	V
59	65	Fr3	P	P	P	P
60	66	Fr3	D	D	D	D

Таблица 5

Последовательности для гуманизации тяжелой цепи 16B5

Остаток по Кабату №		Линейный остаток №		FR или CDR	Родительское МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО МЫШИ SEQ ID №:10	Hu VH акцептор FR B2 SEQ ID №:14	Гуманизированная конструкция v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID №:15
61	67	Fr3	R	R	R	R	R
62	68	Fr3	F	F	F	F	F
63	69	Fr3	T	S	S	S	S
64	70	Fr3	G	G	G	G	G
65	71	Fr3	S	S	S	S	S
66	72	Fr3	G	G	G	G	G
67	73	Fr3	S	S	S	S	S
68	74	Fr3	G	G	G	G	G
69	75	Fr3	T	T	T	T	T
70	76	Fr3	D	D	D	D	D
71	77	Fr3	F	F	F	F	F
72	78	Fr3	T	T	T	T	T
73	79	Fr3	L	L	L	L	L
74	80	Fr3	T	T	T	T	T
75	81	Fr3	I	I	I	I	I
76	82	Fr3	S	S	S	S	S
77	83	Fr3	S	S	S	S	S
78	84	Fr3	V	L	L	L	L
79	85	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q
80	86	Fr3	A	A	A	A	A
81	87	Fr3	E	E	E	E	E
82	88	Fr3	D	D	D	D	D
83	89	Fr3	L	V	V	V	V
84	90	Fr3	A	A	A	A	A
85	91	Fr3	V	V	V	V	V
86	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	93	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	94	Fr3	C	C	C	C	C
89	95	CDR-L3	K	Q	K	K	K
90	96	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	97	CDR-L3	S	Y	S	S	S
92	98	CDR-L3	Y	Y	Y	Y	Y
93	99	CDR-L3	T	S	T	T	T

Таблица 5
Последовательности для гуманизации тяжелой цепи 16B5

Остаток по Кабату №		Линейный остаток №		FR или CDR	Родительское моноклональное антитело мыши SEQ ID №:10	Hu VH акцептор FR B2 SEQ ID №:14	Гуманизованная конструкция v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID №:15
94	100	CDR-L3	L	T	L	L	L
95		CDR-L3		P			
95A		CDR-L3					
95B		CDR-L3					
95C		CDR-L3					
95D		CDR-L3					
95E		CDR-L3					
95F		CDR-L3					
96	101	CDR-L3	R	Q	R	R	R
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	G	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	N	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	V	V	V	V
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	I	I	I	I
106A	112	Fr4	K	K	K	K	K
107	113	Fr4	R	R	R	R	R

ПРИМЕР 6. Аффинность гуманизованных антител 16B5 к тау

[0166] Данные по связыванию для гуманизованных антител 16B5, имеющих конструкцию H1L1 или H1L2, приведены ниже в таблице 7. Для сравнения, также показаны 5 данные по связыванию для химерного 16B5. Данные получены с использованием прибора Вiasoge. Авторы сделали вывод, что версия H1L2 имела наиболее сильную аффинность – по существу такую же, что и химерное 16B5. Гуманизованные 16B5 версии H1L1 и H1L3 также имели достаточную аффинность.

[0167] Измерения поверхностного плазмонного резонанса проводили с использованием Biacore T200 (GE Lifesciences). Все эксперименты проводили с применением подвижной фазы 10 mM ГЭПЭС pH 7,4, 150 mM NaCl и 0,05% твин-20 при 30 мкл/мин, на сенсорном чипе CM5, подготовленном посредством аминного присоединения захватывающего антитела к антигенам мыши или человека. Антитело 16B5 (химерная или гуманизованная форма) связывалось с иммобилизованным захватывающим антителом, и различные концентрации рекомбинантного очищенного hTau-P301L применяли к комплексу антитела при последовательных итерациях. Итерационные стадии разделяли стадиями регенерации с высоким содержанием соли или низким pH. Данные эксперименты повторяли с различными составами антитела и антигена. Анализ проводили со встроенным программным обеспечением Biacore.

Таблица 7

Данные Biacore

	K_D (M)	K_{on}(1/Ms)	K_{on} ошибка	K_{off}(1/s)	K_{off} ошибка
Chi16B5	232 пМ	1,43 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁵	3,33 x 10 ⁻³	3,5 x 10 ⁻⁵
Hu16B5H1L1	617 пМ	3,5 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁴	2,15 x 10 ⁻³	8,2 x 10 ⁻⁶
Hu16B5H1L2	286 пМ	1,2 x 10 ⁷	4,6 x 10 ⁴	3,42 x 10 ⁻³	1,1 x 10 ⁻⁵
Hu16B5H1L3	320 пМ	1,25 x 10 ⁷	6,2 x 10 ⁴	3,98 x 10 ⁻³	1,8 x 10 ⁻⁵

ПРИМЕР 7. Обнаружение тау путем иммунопреципитации с помощью гуманизованных антител 16B5

[0168] Посмертный образец лобной коры пациента с болезнью Альцгеймера с баллами Браака, составлявшим 6, последовательно экстрагировали в буферах с увеличивающейся силой солиubilизации в следующем порядке: (I) буфер с высоким содержанием соли (20 mM Трис, 5 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 10% сахарозы, 7500 mM NaCl, pH 7,4), (II) тритон-буфер (20 mM Трис, 5 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 10% сахарозы, 1% Тритон X100, 500 mM NaCl, pH 7,4) и (III) буфер саркозила (10 mM Трис, 5 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 10% сахарозы, 500 mM NaCl, 1% саркозила, pH 7,4).

[0169] Для каждого образца, 200 микрограммов фракции, растворимой при высоком содержании соли, или 20 микрограммов фракции, нерастворимой в саркозиле, разбавляли в 400 микролитрах буфера для иммунопреципитации (10 mM Трис, 150 mM NaCl, 0,5% Тритон

X100, 1 mM ЭГТА, 1 mM ЭДТА, pH 7,4). Образцы предварительно очищали при помощи магнитных шариков с белком G (New England Biolabs) и в каждую пробирку добавляли 5 микрограммов антитела. Применяемые антитела включали: 1) неиммунное антитело IgG мыши (mIgG) в качестве контроля; 2) неиммунное антитело IgG человека (hIgG) в качестве контроля; 3) химерное антитело 16B5 (Chi16B5); 4) гуманизированное 16B5, версия H1L2 (h16B6-H1L2); и гуманизированное 16B5, версия H1L3 (h16B6-H1L3). Предварительно очищенные лизаты и антитела инкубировали в течение 2 часов при 4 °C. Антитело/антигенные комплексы осаждали при помощи магнитных шариков с белком G, и осадок тщательно промывали ФСБ/350 mM NaCl. После элюирования с использованием буфера Лэммли, элюаты разделяли посредством ДСН-ПААГ и блоттировали с применением поликлональных антител к тау (ДАКО).

[0170] Как показано на фиг. 7, химерное 16B5 и гуманизированные 16B5 H1L2 и H1L3 распознавали тау в обеих растворимых и нерастворимых фракциях из мозга пациентов с болезнью Альцгеймера.

15 ПРИМЕР 8. Иммуногистохимическое определение характеристик и гуманизированных антител 16B5 мыши к тау на мозге при болезни Альцгеймера

[0171] Моноклональное антитело 16B5 мыши к тау и два гуманизированных варианта, h16B5-H1L2 и h16B5-N1D, также протестировали иммуногистохимически на свежемороженых срезах коры головного мозга человека от доноров с болезнью Альцгеймера и не больных данным заболеванием определенного возраста.

Способы:

Ткани головного мозга человека

[0172] Лобную кору получали из научно-исследовательского института здравоохранения Sun Health Research Institute. Случаи включали шесть пациентов (средний возраст $86,8 \pm 0,40$ СКО) с диагнозом болезни Альцгеймера и с подтверждением путем neuropathological оценки при вскрытии, и трех пациентов не больных данным заболеванием определенного возраста (средний возраст $77 \pm 9,7$ СКО). Демографические данные для этих случаев приведены ниже в таблице 8. Иммуногистохимию проводили на слегка зафиксированных в ацетоне 10 мкм криосрезах на предметном стекле.

Таблица 8

Демографические данные для случаев, тестируемых иммуногистохимически

Случай	Диагноз	Возраст (лет)	Пол	Интервал посмертного вскрытия (ч)
11-21	Болезнь Альцгеймера	88	Ж	2,28
03-34	Болезнь Альцгеймера	88	Ж	3,3
08-06	Болезнь Альцгеймера	86	М	2,66
03-52	Болезнь Альцгеймера	86	М	2,2
01-16	Болезнь Альцгеймера	87	М	3
01-18	Болезнь Альцгеймера	86	М	3
10-63	Контроль	79	М	3
10-39	Контроль	93	М	3
10-22	Контроль	59	Ж	3,2

Иммуногистохимия

[0173] Иммунопероксидазный метод являлся главной системой обнаружения, которая состояла из любого полимера, меченого пероксидазой, конъюгированного с антителом козы к иммуноглобулинам мыши (EnVision+System HRP labeled Polymer; Dako K4001), или амплификационной системы Vector ABC для непосредственно биотинилированных гуманизованных антител (ABC Elite Standard; PK-6100; Vector Laboratories). Окрашивание визуализировали с хромогеном ДАБ (Liquid DAB + Substrate Chromogen System; Dako K3468), который образовывал коричневый осадок.

[0174] Отрицательный контроль состоял из выполнения всей иммуногистохимической процедуры на близлежащих срезах при помощи антитела контрольного изотипа IgG или в отсутствии первичного антитела.

Иммунофлуоресцентное мечение

[0175] Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание проводили для определения взаимосвязи между мышинным и гуманизованными вариантами антител, другими антителами

к тау, которые распознают различные фосфорилированные эпитопы и бета-амилоид. Срезы ткани окрашивали параллельно смесью антител, содержащей биотинилированные или FITC-меченые гуманизированные варианты 16B5 (1 мкг/мл) и антитела мыши (или моноклональные 16B5 (1 мкг/мл), AT8 (1:1000), AT100 (1:1000), или 3D6 (1 мкг/мл).

5 Антитела мыши определяли при помощи вторичных антител козы к антителам мыши, конъюгированными с флуорофором 488 или 635 (Invitrogen). Биотинилированные гуманизированные антитела определяли стрептавидином 635.

Предварительная абсорбция

[0176] Для оценки специфичности антител к антигенам-мишеням, 1 мкг/мл антител 16B5
10 предварительно абсорбировали с 50 мкг/мл очищенного P301L тау человека или синуклеина дикого типа (посторонний белок) в течение ночи при 4°C. Затем антитела наносили на ткань и проводили иммуногистохимическую процедуру, как описано выше.

Визуальный анализ

[0177] Стекла исследовали или с помощью микроскопа Olympus BX61, Olympus
15 Nanozoomer 2.0HT, или спектральной конфокальной системы Leica SPE. Изображения получали в виде TIFF файлов.

Результаты

[0178] Как показано ниже в таблице 9, моноклональные антитела 16B5 мыши, и оба
гуманизированные варианта показали реакционную способность с тканью при болезни
20 Альцгеймера, при окрашивании заметны нити нейропиля, несколько нейрофибриллярных клубков (большой частью шаровидных), и несколько тау-положительных нейритических бляшек. Большая часть 16B5 AD-фибриллярной патологии ограничивалась серым веществом, но также обнаружена некоторая реакционная способность в белом веществе. В отличие от этого, контрольная ткань без наличия болезни показала диффузную фоновую реакционную
25 способность, но была отрицательной на наличие для любых патологий, обнаруженных в ткани при болезни Альцгеймера.

[0179] Эксперименты с двойным мечением проводили с моноклональной версией антитела
мышь 16B5 и (1) и гуманизированными вариантами, (2) антителами, распознающими тау в
различных фосфорилированных эпитопах, и (3) бета-амилоид, для дальнейшей
30 характеристики патологий, распознаваемых вариантами антител.

- [0180] И h16B5-H1L2 и h16B5-N1D совместно локализируются с моноклональным антителом 16B5 с высокой конгруэнтностью на AD-фибриллярных патологических структурах. H16B5-H1L2 также обнаруживали патологии, которые демонстрировали иммунореактивность на различных фосфорилированных эпитопах тау, включая серин202 и треонин205 (AT8), серин212 и треонин214 (AT100), и серин396 (антитело собственной разработки (in-house proprietary antibody), 20H1). Наконец, двойное мечение посредством антитела к бета-амилоиду, которое распознает N-концевую аминокислотную последовательность (3D6; aa 1-5), и антитела 16B5, показало очень небольшую совместную локализацию между A β и 16B5-иммунореактивными структурами на амилоидных бляшках.
- 10 [0181] Когда иммунореактивность 16B5 сравнивали с хорошо охарактеризованным коммерчески доступными моноклональным антителом к тау (Dako), то оба окрашивали AD-фибриллярную патологию, которая включала тау-положительные нейритические бляшки, нити нейропиля и нейрофибриллярные клубки.
- [0182] Специфичность антитела оценивали путем предварительной абсорбции с очищенным рекомбинантным тау P301L. Уменьшение окрашивания наблюдали, когда 16B5 предварительно абсорбировали с тау P301L, но на окрашивание не было влияния, если антитела предварительно абсорбировали с посторонним белком (синуклеином дикого типа) в той же молярной концентрации.
- 15 [0183] Срезы, с отсутствием контрольных антител IgG-изотипа и первичных антител, имели отрицательное окрашивание по всех тестируемых тканях.
- 20

Таблица 9

Иммуногистохимическая характеристика антител 16B5

Антитело	Лот №	Окрашивание ткани при болезни Альцгеймера (AD)	Концентрация
16B5 мыши	NB-0174A	Да	1 мкг/мл
Химерное 16B5	061512	Да	1 мкг/мл
h16B5-H1L2	NB-0248	Да	1 мкг/мл
H16B5-N1D	011113	Да	1 мкг/мл

[0184] Все публикации (включая учетные номера GenBank, учетные номера UniProtKB/Swiss-Prot и т.п.), патенты и заявки на патент, процитированные в настоящем документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент и заявка на патент была
5 конкретно и отдельно указана, как включенная посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. В случае любых отклонений в последовательностях, связанных с учетными номерами Genbank и UniProtKB/Swiss-Prot и тому подобное, заявка ссылается на последовательности, связанные с цитируемыми учетными номерами, как действительная дата
10 подачи заявки означает фактическую дату подачи или более раннюю дату приоритетной заявки, раскрывающую соответствующий учетный номер. Любую особенность, стадию, элемент, вариант реализации или аспект настоящего изобретения можно применять в сочетании с любыми другими, если специально не указано иное. Несмотря на то, что настоящее изобретение довольно подробно описано посредством иллюстраций и примеров в целях обеспечения ясности и понимания, будет очевидно, что можно осуществлять
15 некоторые изменения и модификации в рамках прилагаемых пунктов формулы изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Шуберт, Питер
 Долан, Филипп Джеймс III
 Лю, Юэ
 Барбур, Робин

<120> ИММУНОТЕРАПИЯ ТАУ

<130> 057450/442367

<140> PCT/US2014/025044

<141> 2014-03-12

<150> US 61/780,624

<151> 2013-03-13

<150> US 61/800,382

<151> 2013-03-15

<160> 34

<170> FastSEQ для версии Windows 4.0

<210> 1

<211> 434

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Ala	Glu	Pro	Arg	Gln	Glu	Phe	Glu	Val	Met	Glu	Asp	His	Ala	Gly
1				5					10					15	
Thr	Tyr	Gly	Leu	Gly	Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His
			20					25					30		
Gln	Asp	Gln	Glu	Gly	Asp	Thr	Asp	Ala	Gly	Leu	Lys	Glu	Ser	Pro	Leu
		35					40					45			
Gln	Thr	Thr	Glu	Asp	Gly	Ser	Glu	Glu	Pro	Gly	Ser	Glu	Thr	Ser	Asp
		50				55					60				
Ala	Lys	Ser	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Thr	Ala	Pro	Leu	Val	Asp
65					70					75					80
Glu	Gly	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Ala	Ala	Ala	Gln	Pro	His	Thr	Glu	Ile
				85					90					95	
Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Ala	Glu	Glu	Ala	Gly	Ile	Gly	Asp	Pro	Ser	Leu
				100				105					110		
Glu	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Val	Thr	Gln	Ala	Arg	Met	Val	Ser	Lys
		115					120					125			
Ser	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly	Ala	Asp
		130				135					140				
Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	Gly	Gln
145					150					155					160
Lys	Gly	Gln	Ala	Asn	Ala	Thr	Arg	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro
				165					170					175	
Lys	Thr	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Arg	Ser
			180					185					190		
Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Arg
		195					200				205				
Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys	Val	Ala
					210			215				220			
Val	Val	Arg	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys	Ser	Arg	Leu	Gln
225					230					235					240
Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Lys	Ser	Lys	Ile
					245					250					255

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

<210> 2
 <211> 406
 <212> ΠPT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser Asp
 50 55 60
 Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp
 65 70 75 80
 Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg
 85 90 95
 Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Ala Lys
 100 105 110
 Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro
 115 120 125
 Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr
 130 135 140
 Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser
 145 150 155 160
 Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 165 170 175
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 180 185 190
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 195 200 205
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 210 215 220
 Lys Ser Lys Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
 245 250 255

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

<210> 3

<211> 377

<212> IIPT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
 35 40 45
 Gly Ile Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr
 50 55 60
 Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp
 65 70 75 80
 Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg
 85 90 95
 Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Arg Ile Pro
 100 105 110
 Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro
 115 120 125
 Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly
 130 135 140
 Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr
 145 150 155 160
 Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
 165 170 175
 Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
 180 185 190
 Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
 195 200 205
 Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 210 215 220
 Asn Val Gln Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val
 245 250 255
 Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Val Gln
 275 280 285

Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
 305 310 315
 Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
 325 330 335
 Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 340 345 350
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 355 360 365
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375

<210> 4
 <211> 404
 <212> IIPT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser Asp
 50 55 60
 Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val Asp
 65 70 75 80
 Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu Ile
 85 90 95
 Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Pro Ser Leu
 100 105 110
 Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys
 115 120 125
 Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp
 130 135 140
 Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln
 145 150 155 160
 Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro
 165 170 175
 Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser
 180 185 190
 Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
 195 200 205
 Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala
 210 215 220
 Val Val Arg Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln
 225 230 235 240
 Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile
 245 250 255
 Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln
 260 265 270
 Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Gly Ser
 275 280 285
 Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys
 290 295 300
 Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser
 305 310 315 320
 Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu
 325 330 335
 Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
 340 345 350

Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro
 355 360 365
 Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp
 370 375 380
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala
 385 390 395 400
 Lys Gln Gly Leu

<210> 5
 <211> 375
 <212> ΠPT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser Asp
 50 55 60
 Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Ala Gly Ile Gly Asp
 65 70 75 80
 Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg
 85 90 95
 Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Ala Lys
 100 105 110
 Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro
 115 120 125
 Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr
 130 135 140
 Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser
 145 150 155 160
 Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 165 170 175
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 180 185 190
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 195 200 205
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 210 215 220
 Lys Ser Lys Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 245 250 255
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 260 265 270
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Ser Lys
 275 280 285
 Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys
 290 295 300
 Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly
 325 330 335
 Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp
 340 345 350
 Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala
 355 360 365
 Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375

<210> 6
<211> 352
<212> ППТ
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
35 40 45
Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60
Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65 70 75 80
Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
85 90 95
Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
100 105 110
Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
115 120 125
Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140
Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145 150 155 160
Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175
Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190
Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205
Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
210 215 220
Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
225 230 235 240
His Lys Pro Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
245 250 255
Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
260 265 270
His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
275 280 285
Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
290 295 300
Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
305 310 315 320
Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
325 330 335
Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
340 345 350

<210> 7
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 7

ctaatacgc tcactatagg gc

<210> 8
<211> 26
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 8
ctcaattttc ttgtccacst tgggtgc

26

<210> 9
<211> 26
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 9
ctcaagtttt ttgtccaccg tgggtgc

26

<210> 10
<211> 225
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 10
Met Asp Trp Val Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15
Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe
35 40 45
Thr Tyr His Gly Met Asp Trp Val Lys Gln Ala Pro Trp Gly Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Val Gly
85 90 95
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110
Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Arg Asp Phe Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln
115 120 125
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
130 135 140
Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
145 150 155 160
Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
165 170 175
Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190
Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
195 200 205
Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
210 215 220

Ser
225

<210> 11
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 11
Tyr His Gly Met Asp
1 5

<210> 12
<211> 17
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 12
Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 13
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 13
Arg Arg Asp Phe Thr Met Asp Phe
1 5

<210> 14
<211> 118
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Ala Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Arg Gly Gln Asn Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 117

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr His
20 25 30
Gly Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Arg Asp Phe Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 230

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 16

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Gly Thr Cys Gly Asn Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30
Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln
50 55 60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Asn
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
130 135 140
Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe
145 150 155 160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp
165 170 175
Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys
195 200 205
Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys
210 215 220
Thr Ser Thr Ser Pro Ile
225 230

<210> 17
<211> 17
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 17
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 18
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 18
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 19
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 19
Lys Gln Ser Tyr Thr Leu Arg Thr
1 5

<210> 20
<211> 114
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 20
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30
Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys Arg

<210> 21
<211> 113
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 21
Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95
Ser Tyr Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 22
<211> 113
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 22
Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95
Ser Tyr Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 23
<211> 113
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 23
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95
Ser Tyr Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 24
<211> 10
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 24
Gly Tyr Pro Phe Thr Tyr His Gly Met Asp
1 5 10

<210> 25
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 25
cagggtccagt tgggtgcagtc tggatctgag ctgaagaagc ctggagcctc cgtcaagggtg 60
tcctgcaagg cttctgggta tcccttcaca taccatggaa tggactgggt gcgtcagggt 120
cctggtcagg gtttagagtg gatgggctgg ataaacacct actctggagt gccaacatat 180
gctgatgact tcaagggacg atttgtgttc tctttggaca cctctgtctc tactgcctat 240
ttgcagatct cttctctcaa agccgaggac acggccgtgt atttttgtgc aagacggcgt 300
gattttacaa tggacttctg ggggtcaagga accaccgtga ccgtctcctc a 351

<210> 26
<211> 339
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 26

```
aacatcgtgc tgaccsagag ccccgatagc ctggccgtga gcctggggcga gagagccacc 60
atcaactgca agagcagcca gagcctgctg aacagcagga ccaggaagaa ctacctggcc 120
tggttccagc agaagcccgg ccagagcccc aagctgctga tctactgggc cagcaccagg 180
gagagcggcg tgcccgatag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgattt caccctgacc 240
atcagcagcc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcaagcagag ctacaccctg 300
agaaccttcg gcggcggcac caaggtggaa attaaacgt 339
```

<210> 27

<211> 339

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 27

```
aacatcgtgc tgaccsagag ccccgatagc ctggccgtga gcctggggcga gagagccacc 60
atcaactgca agagcagcca gagcctgctg aacagcagga ccaggaagaa ctacctggcc 120
tggttccagc agaagcccgg ccagagcccc aagctgctga tctactgggc cagcaccagg 180
gagagcggcg tgcccgatag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgattt caccctgacc 240
atcagcagcc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcaagcagag ctacaccctg 300
agaaccttcg gcggcggcac caaggtggaa attaaacgt 339
```

<210> 28

<211> 339

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 28

```
gacatcgtgc tgaccsagag ccccgatagc ctggccgtga gcctggggcga gagagccacc 60
atcaactgca agagcagcca gagcctgctg aacagcagga ccaggaagaa ctacctggcc 120
tggttccagc agaagcccgg ccagagcccc aagctgctga tctactgggc cagcaccagg 180
gagagcggcg tgcccgatag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgattt caccctgacc 240
atcagcagcc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcaagcagag ctacaccctg 300
agaaccttcg gcggcggcac caaggtggaa attaaacgt 339
```

<210> 29

<211> 330

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 29

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65          70          75          80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85          90          95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
```


<223> Синтезированная

<400> 31

```
ggtgagtgga tccgcggccg ctaaactctg aggggggtcgg atgacgtggc cattctttgc 60
ctaaagcatt gagtttactg caaggtcaga aaagcatgca aagccctcag aatgggtgca 120
aagagctcca acaaaaacaat ttagaacttt attaaggaat agggggaagc taggaagaaa 180
ctcaaaacat caagatttta aatacgcttc ttgggtctcct tgctataatt atctgggata 240
agcatgctgt tttctgtctg tccctaacat gccctgtgat tatccgcaaa caacacacc 300
aagggcagaa ctttgttact taaacacat cctgtttgct tctttcctca gcctccacca 360
agggccatc ggtcttcccc ctggcacct cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg 420
ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg tggaaactcag 480
gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca ggactctact 540
ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc tacatctgca 600
acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc aaatcttgtg 660
acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct 720
tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat 780
gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg 840
gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc 900
gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt 960
gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag 1020
ggcagccccg agaaccacag gtgtacacgc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga 1080
accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgcacatc gccgtggagt 1140
gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg 1200
acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga 1260
acgtcttctc atgctcctg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc 1320
tctccctgtc cccgggtaaa tga 1343
```

<210> 32

<211> 106

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 32

```
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105
```

<210> 33

<211> 318

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 33

```
acggtggtcgt caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
aagggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
```


aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300
ttcaacaggg gagagtgt 318

<210> 34

<211> 671

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 34

cgtgagtgga tccgcggccg ctaaactctg agggggtcgg atgacgtggc cattctttgc 60
ctaaagcatt gagtttactg caaggtcaga aaagcatgca aagccctcag aatggctgca 120
aagagctcca acaaaacaat ttagaacttt attaaggaat agggggaagc taggaagaaa 180
ctcaaaacat caagatthta aatacgcttc ttggctcctt tgctataatt atctgggata 240
agcatgctgt tttctgtctg tccctaacat gccctgtgat tatccgcaa caacacaccc 300
aagggcagaa ctttgttact taaacacat cctgtttgct tctttcctca ggaactgtgg 360
ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatc ggaactgcct 420
ctggtgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg 480
ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca 540
gcacctacag ctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag 600
tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag agcttcaaca 660
gggagagtg t 671

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое конкурирует с антителом 16B5 за связывание с тау.
2. Моноклональное антитело по п.1, которое представляет собой гуманизированное, химерное, венерованное антитело или антитело человека.
3. Моноклональное антитело по п.1, которое принадлежит изотипу IgG человека.
4. Моноклональное антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанный изотип представляет собой IgG1.
5. Моноклональное антитело по п. 4, имеющее по меньшей мере одну мутацию в константной области.
6. Моноклональное антитело по п.1, которое принадлежит изотипу IgG2 или IgG4 человека.
7. Моноклональное антитело по п.1, которое представляет собой гуманизированную, химерную или венерованную форму моноклонального антитела 16B5.
8. Моноклональное антитело по п. 1, которое имеет три CDR легкой цепи, как определено по Кабату, и три CDR тяжелой цепи, как определено по Кабату, моноклонального антитела 16B5.
9. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8).
10. Антитело по п. 9, которое представляет собой антитело человека, гуманизированное, химерное или венерованное антитело.
11. Антитело по п. 10, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 25-44 последовательности SEQ ID №:1.
12. Антитело по п. 11, которое представляет собой гуманизированное, химерное или венерованное антитело, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 30-39 последовательности SEQ ID №:1.

13. Антитело по п. 1, которое связывается с тау в фосфорилированной и нефосфорилированной формах.

14. Антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID №:15, и зрелую переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID №:22.

15. Антитело по п. 14, содержащее, согласно Кабату, три CDR последовательности SEQ ID №:15 и, согласно Кабату, три CDR последовательности SEQ ID №:22.

16. Антитело по п. 14 или 15, в котором по меньшей мере одна из позиций H13, H48 и H91 занята К, М и F, соответственно, и по меньшей мере одна из позиций L1, L4, L36 и L43 занята N, L, F и S, соответственно.

17. Антитело по п. 16, в котором позиции H13, H48 и H91 заняты К, М и F, соответственно, и по меньшей мере две из позиций L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно.

18. Антитело по п. 17, в котором позиции H13, H48 и H91 заняты К, М и F, соответственно, и по меньшей мере три из позиций L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно.

19. Антитело по п. 17, в котором позиции H13, H48 и H91 заняты К, М и F, соответственно, и позиции L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно.

20. Антитело по любому из пп. 14-16, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID №:15, и зрелую переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID №:22.

21. Антитело по любому из пп. 14-20, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи сшита с константной областью тяжелой цепи, и указанная зрелая переменная область легкой цепи сшита с константной областью легкой цепи.

22. Антитело по любому из пп. 14-21, отличающееся тем, что указанная константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области человека, связывание которой с рецептором Fcγ ослаблено по сравнению с природной константной областью человека.

23. Антитело по любому из пп. 21 или 22, отличающееся тем, что указанная константная область тяжелой цепи принадлежит изоотипу IgG1.

24. Антитело по любому из пп. 14-23, в котором любые отличия CDR указанной зрелой переменной области тяжелой цепи и указанной зрелой переменной области легкой цепи от SEQ ID №: 15 и 22, соответственно, находятся в позициях H60-H65.

25. Антитело по любому из пп. 14, 22 и 24, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID №:15, и указанная зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID №:21, 22 или 23.

26. Антитело по любому из пп. 14-25, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID №:15, и указанная зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID №:22.

27. Антитело по любому из пп. 14-26, отличающееся тем, что указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

28. Антитело по любому из пп. 1-27, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой Fab-фрагмент.

29. Полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую и/или легкую цепи антитела по пп. 14-28.

30. Способ гуманизации антитела, включающий:

определение последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи антитела мыши;

синтезирование нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновой кислоты,

кодирующей гуманизованную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и

экспрессию указанных нуклеиновых кислот в клетке-хозяине с получением гуманизованного антитела,

при этом антитело мыши представляет собой 16B5.

31. Способ получения гуманизованного, химерного или венероанного антитела, включающий:

культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелые и легкие цепи указанного антитела, таким образом, что клетка секретирует указанное антитело; и

очистку указанного антитела от культуральной среды,

при этом указанное антитело представляет собой гуманизованную, химерную или венероанную форму 16B5.

32. Способ получения клеточной линии, продуцирующей гуманизованное, химерное или венероанное антитело, включающий:

введение в клетки вектора, кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела и селективный маркер;

размножение указанных клеток в условиях, обеспечивающих возможность отбора клеток, имеющих увеличенное число копий указанного вектора;

выделение отдельных клеток из указанных отобранных клеток; и

формирование банка клеток, клонированных из одной клетки, выбранной на основании выхода антитела; при этом указанное антитело представляет собой гуманизованную, химерную или венероанную форму 16B5.

33. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

34. Выделенный фрагмент тау, содержащий 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8).

35. Фрагмент по п. 34, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 30-39 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8).

36. Фрагмент по п. 34, который содержит остатки 33-37 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8).

37. Выделенный фрагмент по п. 34, связанный с молекулой-носителем, необязательно через спейсер, которая способствует выработке антител к указанному фрагменту.

38. Фармацевтическая композиция, содержащая фрагмент по п. 34 и адъювант, приемлемый для введения людям.

39. Способ лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера, включающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует такое антитело, пациенту, имеющему болезнь Альцгеймера, или пациенту с риском развития болезни Альцгеймера с обеспечением тем самым лечения или профилактики указанного заболевания.

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой антитело по любому из пп. 14-28.

41. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанный агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №: 1.

42. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанный пациент является носителем ApoE4.

43. Способ лечения или осуществления профилактики заболевания, ассоциированного с тау, включающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует такое антитело, пациенту, имеющему указанное заболевание или имеющему риск развития указанного заболевания, с обеспечением тем самым лечения или профилактики указанного заболевания.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой антитело по любому из пп. 14-28.

45. Способ по п. 43, отличающийся тем, что указанный агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №: 1.

46. Способ по п. 43, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

47. Способ уменьшения аберрантного переноса тау, включающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует такое антитело, пациенту, имеющему ассоциированное с аберрантным переносом тау заболевание или имеющему риск развития указанного заболевания, с обеспечением тем самым лечения или профилактики указанного заболевания.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой антитело по любому из пп. 14-28.

49. Способ по п. 47, отличающийся тем, что указанный агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №: 1.

50. Способ индукции фагоцитоза тау, включающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует такое антитело, пациенту, имеющему ассоциированное с накоплением тау заболевание или имеющему риск развития указанного заболевания.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой антитело по любому из пп. 14-28.

52. Способ по п. 50, отличающийся тем, что указанный агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №: 1.

53. Способ по п. 50, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

54. Способ ингибирования агрегации или отложения тау, включающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует такое антитело, пациенту, имеющему ассоциированное с агрегацией или отложением тау заболевание или имеющему риск развития указанного заболевания

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой антитело по любому из пп. 14-28.

56. Способ по п. 54, отличающийся тем, что указанный агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №: 1.

57. Способ по п. 54, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

58. Способ ингибирования образования клубков тау, включающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агента, который индуцирует такое антитело, пациенту, имеющему ассоциированное с образованием клубков тау заболевание или имеющему риск развития указанного заболевания.

59. Способ по п. 58, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой антитело по любому из пп. 14-28.

60. Способ по п. 58, отличающийся тем, что указанный агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №: 1.

61. Способ по п. 58, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

62. Способ скрининга агента в отношении активности против болезни Альцгеймера, включающий введение указанного агента трансгенному животному, экспрессирующему трансген тау, и определение того, ингибирует ли или задерживает ли указанный агент по меньшей мере один признак или симптом болезни Альцгеймера, где указанный агент представляет собой антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID №:1 (Swiss-Prot № P10636-8), или агент, который индуцирует такое антитело.

63. Нуклеиновая кислота, содержащая сегмент, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID №: 10.

64. Нуклеиновая кислота, содержащая сегмент, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID №: 15.

65. Нуклеиновая кислота по п. 64, отличающаяся тем, что указанный сегмент имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 25.

66. Нуклеиновая кислота по п. 64 или 65, дополнительно содержащая сегмент, кодирующий константную область IgG1.

67. Нуклеиновая кислота по п. 66, отличающаяся тем, что указанная константная область IgG1 представляет собой константную область IgG1 человека.

68. Нуклеиновая кислота по п. 67, отличающаяся тем, что указанная константная область IgG1 имеет последовательность SEQ ID №: 29, при условии, что С-концевой лизин может быть опущен.

69. Нуклеиновая кислота по п. 68, отличающаяся тем, что указанный сегмент, кодирующий константную область IgG1, имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 30.

70. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 66-69, дополнительно содержащая интрон, связывающий сегменты, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи и константную область IgG1.

71. Нуклеиновая кислота по п. 70, отличающаяся тем, что указанный сегмент, кодирующий константную область IgG1, имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 31.

72. Нуклеиновая кислота, содержащая сегмент, кодирующий вариабельную область легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID №: 16.

73. Нуклеиновая кислота, содержащая сегмент, кодирующий вариабельную область легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID №: 21, SEQ ID №: 22 или SEQ ID №: 23.

74. Нуклеиновая кислота по п. 73, отличающаяся тем, что указанный сегмент, кодирующий вариабельную область легкой цепи, имеет последовательность SEQ ID №: 26, SEQ ID №: 27 или SEQ ID №: 28.

75. Нуклеиновая кислота по п. 73 или 74, дополнительно содержащая сегмент, кодирующий каппа-константную область.

76. Нуклеиновая кислота по п. 75, отличающаяся тем, что указанная каппа-константная область представляет собой каппа-константную область человека.

77. Нуклеиновая кислота по п. 76, отличающаяся тем, что указанная каппа-константная область имеет последовательность SEQ ID №: 32.

78. Нуклеиновая кислота по п. 77, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота, кодирующая каппа-константную область, имеет последовательность SEQ ID №: 33.

79. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 75-78, дополнительно содержащая интрон, связывающий сегмент, кодирующий вариабельную область легкой цепи, с сегментом, кодирующим указанную каппа-константную область.

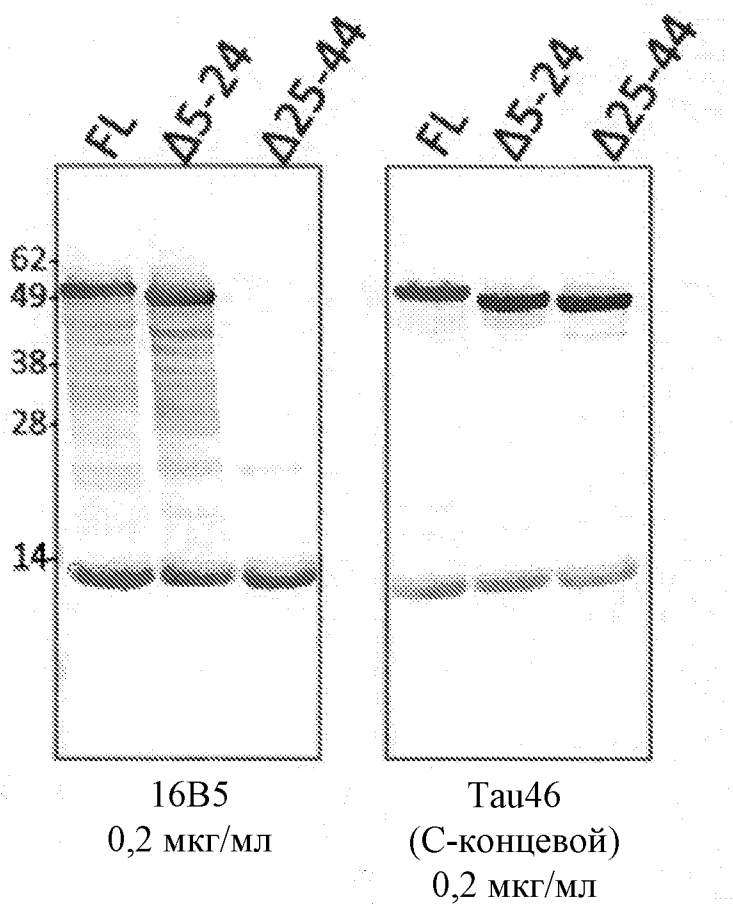
80. Нуклеиновая кислота по п. 79, отличающаяся тем, что указанный сегмент, кодирующий каппа-константную область, имеет последовательность SEQ ID №: 34.

81. Антитело по любому из пп. 1-28, отличающееся тем, что тяжелая цепь антитела содержит константный домен IgG1 человека, имеющий последовательность SEQ ID №: 29.

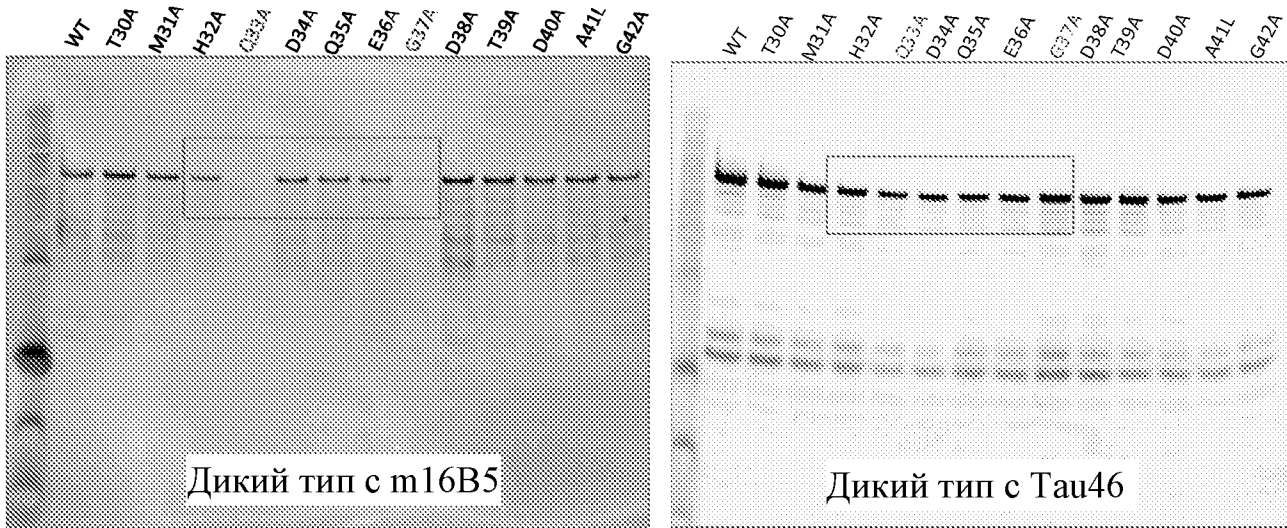
82. Антитело по любому из пп. 1-28, отличающееся тем, что легкая цепь антитела содержит каппа-константную область человека, имеющую последовательность SEQ ID №: 32.

83. Нуклеиновая(ые) кислота(ы), кодирующая(ие) переменную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID №:15 и/или переменную область легкой цепи последовательности SEQ ID №:21, 22 или 23.

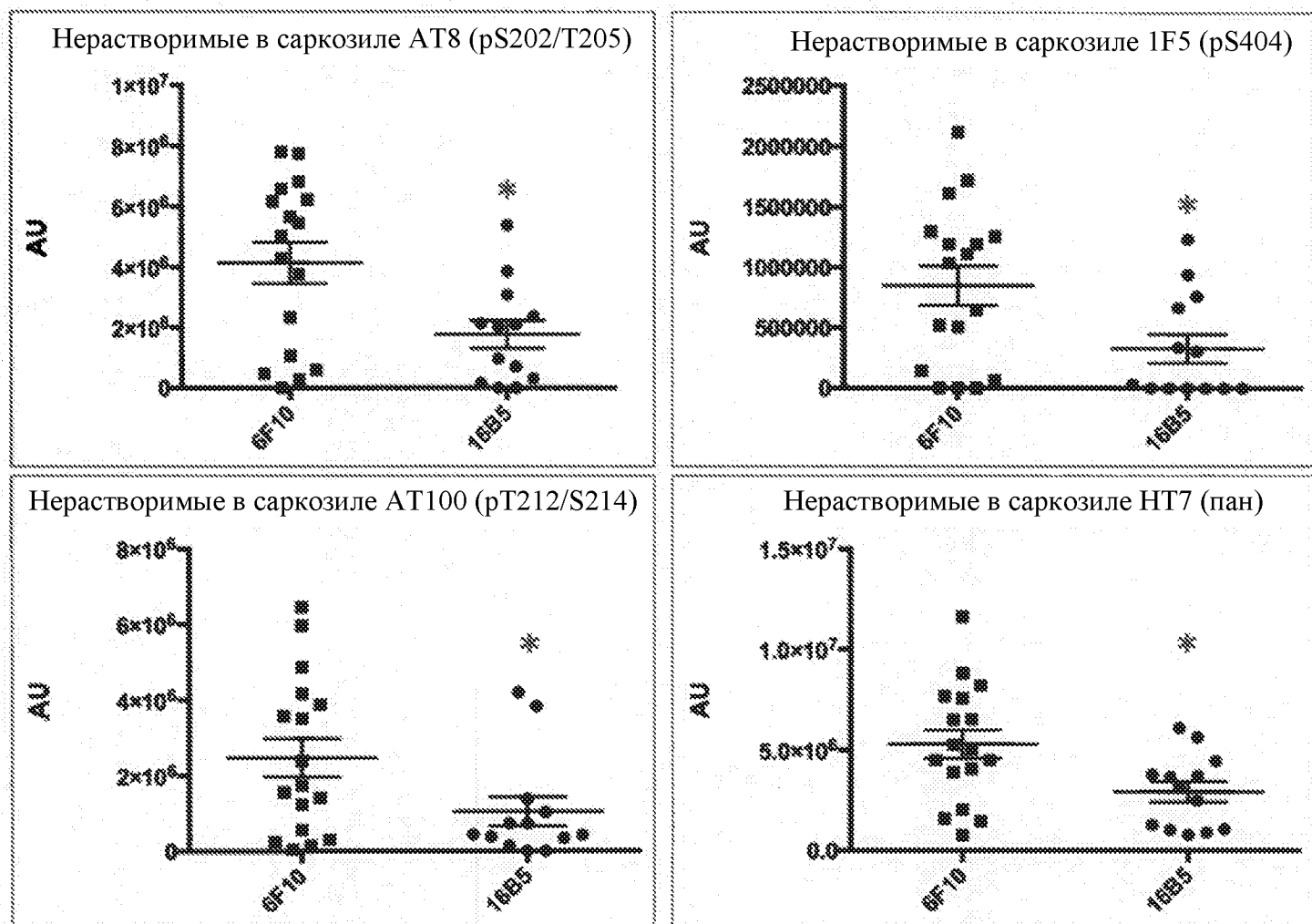
Фигура 1



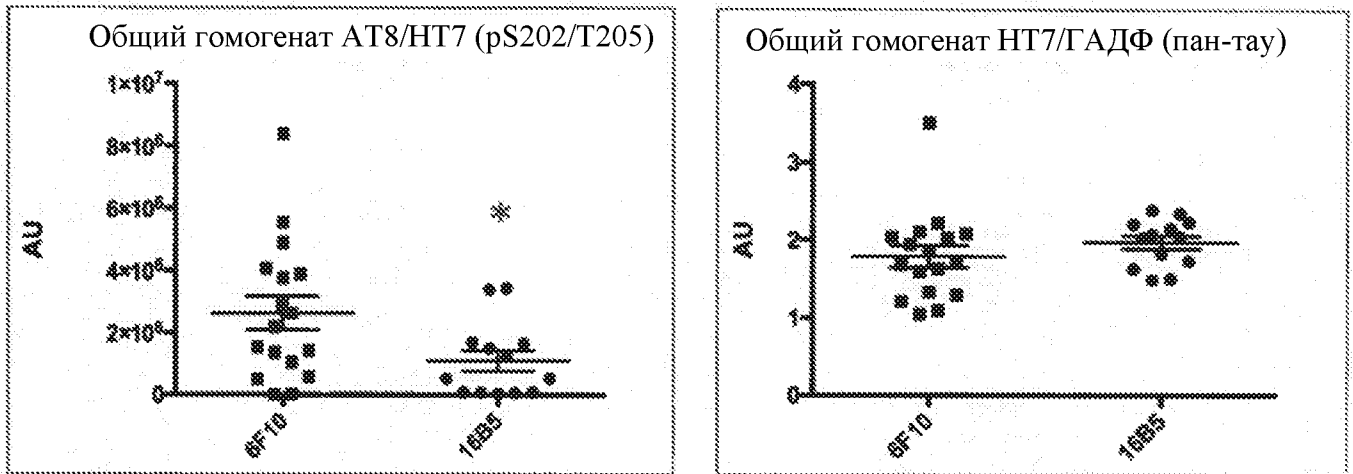
Фигура 3



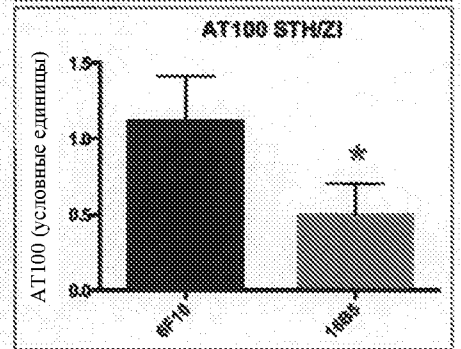
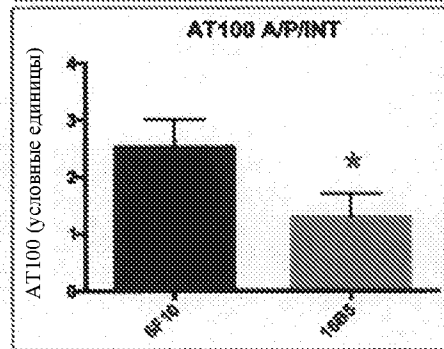
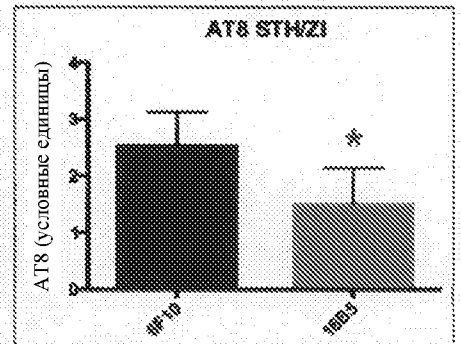
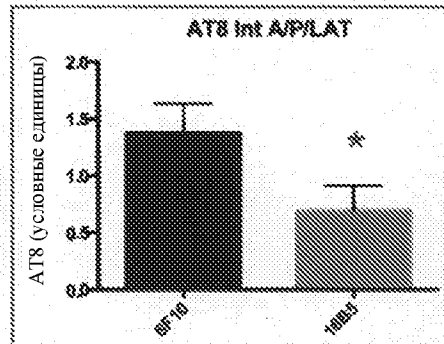
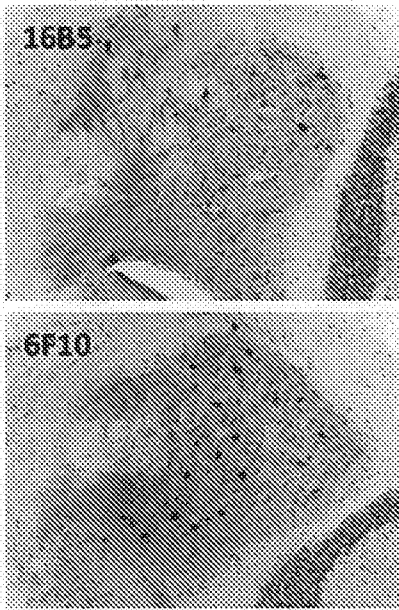
Фигура 4



Фигура 5



Фигура 6



Фигура 7