

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047155**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.06.11**

**(21)** Номер заявки  
**202192113**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2020.02.07**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**C07K 14/435** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

---

**(54) АНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ ТАУ**

---

**(31)** 62/803,334; 62/813,124; 62/855,434

**(32)** 2019.02.08; 2019.03.03; 2019.05.31

**(33)** US

**(43)** 2021.10.18

**(86)** PCT/US2020/017357

**(87)** WO 2020/163817 2020.08.13

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ПРОТЕНА БИОСАЙЕНСИС  
ЛИМИТЕД (IE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Долан III Филип Джеймс, Ниджджар  
Тарлохан С., Александер Светлана,  
Барбур Робин, Тэм Стивен Джд (US)**

**(74)** Представитель:  
**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,  
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

**(56)** WO-A2-2017062672  
US-A1-20150253341  
WO-A2-2014165271  
US-A1-20160376351  
WO-A1-2018156250  
US-A1-20140294839  
US-A1-20140171373

KAWAHARA, K. et al.: The Novel Monoclonal Antibody 9F5 Reveals Expression of a Fragment of GPNMB/Osteoactivin Processed by Furin-like Protease(s) in a Subpopulation of Microglia in Neonatal Rat Brain. *Glia*. November 2016, Epub 27 July 2016, Vol. 64, No. 11; pages 1938-1961; abstract; DOI: 10.1002/glia.23034

STRANG, KH et al.: Generation and characterization of new monoclonal antibodies targeting the PHF1 and AT8 epitopes on human tau. *Acta Neuropathologica Communications*. 31 July 2017, Vol. 5, No. 58; pages 1-11; DOI: 10.1186/S40478-017-0458-0

CROFT, CL et al.: Novel monoclonal antibodies targeting the microtubule-binding domain of human tau. *PLoS One*. Epub 2 April 2018, Vol. 13, No. 4; pages 1-13; DOI: 10.1371/journal.pone.0195211

---

**(57)** В изобретении предложены антитела, которые специфически связывают тау. Антитела по изобретению ингибируют или задерживают развитие патологий, ассоциированных с тау, и ассоциированного с ними ухудшения симптоматики.

---

**B1**

**047155**

**047155 B1**

В данной заявке испрашивается приоритет согласно 35 USC §119(e) по предварительной патентной заявке США № 62/803334, поданной 8 февраля 2019 г. предварительной патентной заявке США № 62/813124, поданной 3 марта 2019 г., и предварительной патентной заявке США № 62/855434, поданной 31 мая 2019 г., каждая из которых включена в данный документ в полном объеме для всех целей.

#### **Ссылка на перечень последовательностей**

Перечень последовательностей, записанный в файле 2020\_02\_07\_542496WO\_SEQLIST.txt, имеющем размер 3560 килобайт, был создан 7 февраля 2020 г. и настоящим включен в данный документ посредством ссылки.

#### **Уровень техники**

Тау представляет собой широко 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). Сообщалось, что тау играет роль в стабилизации микротрубочек, особенно в центральной нервной системе. Общий тау (t-тау, т.е. фосфорилированная и нефосфорилированная формы) и фосфо-тау (p-тау, т.е. фосфорилированный тау) высвобождаются головным мозгом в ответ на повреждение нейронов и нейродегенерацию, и, как сообщается, их уровень в СМЖ пациентов с болезнью Альцгеймера является повышенным по сравнению с общей популяцией (Jack et al., Lancet Neurol 9: 119-28 (2010)).

Тау является основным компонентом нейрофибриллярных клубков, которые наряду с бляшками являются характерным признаком болезни Альцгеймера. Клубки представляют собой аномальные фибриллы диаметром 10 нм, расположенные попарно в виде спирали с регулярной периодичностью 80 нм. Тау в нейрофибриллярных клубках аномально фосфорилируется (гиперфосфорилируется) с помощью фосфатных групп, прикрепленных к определенным участкам молекулы. При болезни Альцгеймера тяжелое поражение нейрофибриллярных клубков наблюдается в нейронах слоя II энторинальной коры, СА1 и субкулиарных областях гиппокампа, миндалевидном теле и более глубоких слоях (слои III, V и поверхностный слой VI) неокортекса. Также сообщалось, что гиперфосфорилированный тау нарушает сборку микротрубочек, что может способствовать разрушению нейронной сети.

Включения тау являются частью определяющей нейропатологии нескольких нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, лобно-височную лобарную дегенерацию, прогрессирующий надъядерный паралич и болезнь Пика.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

В одном аспекте в изобретении предложено выделенное моноклональное антитело, которое конкурирует с антителом 9F5 за связывание с человеческим тау. В некоторых таких антителах CDR-H3 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 10. В некоторых таких антителах CDR-H1 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 8. В некоторых таких антителах CDR легкой цепи CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 имеют аминокислотные последовательности, включающие SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно). В некоторых таких антителах CDR-H1 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 8. Некоторые такие антитела связываются с тем же эпитопом на тау человека, что и 9F5.

Некоторые такие антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 9F5, где 9F5 является мышинным антителом, характеризующимся вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 7, и вариабельной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 11.

В некоторых таких антителах три CDR тяжелой цепи CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно), за исключением того, что положение H28 может быть занято N или T, положение H51 может быть занято I или V, положение H54 может быть занято N или D, а положение H56 может быть занято D или E, и три CDR легкой цепи CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно), за исключением того, что положение L27b занято L, D, T или Q, положение L27c занято L, D, G, S, E, T, N, A, P или I, положение L30 может быть занято I, Y, E, K, G или Q, положение L31 может быть занято T, N или G, положение L33 занято L N, T, S, R или G, положение L51 может быть занято M, G, E, D, K или I, положение L54 может быть занято L, R, G или T, положение L89 занято A или G, положение L92 занято L, D, E, G, Q, T или I, а положение L93 занято E или G.

В некоторых антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 50. В некоторых антителах CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 51. В некоторых антителах CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 52. В некоторых антителах CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность, включающую любую из SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 172-193. В некоторых антителах CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность, включающую любую из SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 194-205. В некоторых антителах CDR-L3 имеет аминокислотную последовательность, включающую любую из SEQ ID NO: 206-213. В некоторых антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность,

включающую SEQ ID NO: 50, а CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 51. В некоторых антителах CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 53, а CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 55. В некоторых антителах CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 54, а CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 55.

Некоторые антитела представляют собой 9F5 или его химерную, венеризованную или гуманизированную форму. В некоторых антителах переменная область тяжелой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых антителах переменная область легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых антителах каждая из переменных областей тяжелой цепи и переменной области легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с последовательностью зародышевой линии человека. Некоторые антитела представляют собой гуманизированные антитела.

Некоторые антитела представляют собой гуманизированное или химерное антитело 9F5, которое специфически связывается с человеческим тау, где 9F5 представляет собой мышиное антитело, характеризующееся зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 11. Некоторые антитела содержат гуманизированную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 9F5, и гуманизированную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 9F5. В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы Kabat, Chothia, композитному определению по Kabat/Chothia, AbM и Contact.

В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 9F5 согласно композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8-10), а гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 9F5 согласно композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 9F5 по Kabat (SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10), а гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 9F5 по Kabat (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 9F5 по Chothia (SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 10), а гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 9F5 по Chothia (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 9F5 по AbM (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 10), а гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 9F5 по AbM (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 9F5 по Contact (SEQ ID NO: 44-46), а гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 9F5 по Contact (SEQ ID NO: 47-49).

Например, антитело может представлять собой гуманизированное антитело, венеризованное антитело или химерное антитело.

Некоторые такие антитела содержат гуманизированную зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 15-22 и SEQ ID NO: 109-129, и гуманизированную зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 23-29, SEQ ID NO: 61-108 и SEQ ID NO: 130-171.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H1 занято E, H17 занято T, H20 занято I, H69 занято M, H75 занято T, H93 занято T, H94 занято T, а H109 занято V. В некоторых антителах положения H1, H17, H20, H69, H75, H94 и H109 заняты E, T, I, M, T, T, T и V соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H66 занято R, а H81 занято E. В некоторых антителах положения H66 и H81 заняты R и E, соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H23 занято I, а H83 занято R. В некоторых антителах положения H23 и H83 заняты K и R, соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H43 занято K, H51 занято V, H76 занято D, M80 занято M, а H108 занято L. В некоторых антителах положения H43, H51, H76, H80 и H108 заняты K, V, D, M и L соответственно.

В некоторых антителах положение H28 в области VH занято T.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H54 занято D, а H56 занято E. В некоторых антителах положения H54 и H56 заняты D и E соответственно.

В некоторых антителах положение H40 в области VH занято A.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H5 занято V, H11 занято V, H12 занято K, H38 занято R и H42 занято G. В некоторых антителах положения H5, H11, H12, H38 и H42 заняты V, V, K, R и G соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H1 занято Q или E, H5 занято Q или V, H11 занято L или V, H12 занято V или K, H17 занято S или T, H20 занято L или I, H23 занято T или K, H28 занято N или T, H38 занято K, R или Q, H40 занято R или A, H42 занято E или G, H43 занято Q или K, H48 занято I или M, H51 занято I или V, H54 занято N или D, H56 занято D или E, H66 занято K или R, H69 занято I или M, H75 занято S или T, H76 занято N или D, H79 занято Y, Q, D, N или G, H80 занято L, M, P, D, G или E, H81 занято Q или E, H82 занято L, P, K, R, E или N, H82a занято S или G, H82c занято L, G, D или S, H83 занято T или R, H93 занято A или T, H94 занято S или T, H108 занято T или L, H109 занято L или V.

В некоторых антителах положения H1, H17, H20, H69, H75, H93, H94 и H109 в области VH заняты E, T, I, M, T, T и V соответственно. В некоторых антителах положения H1, H17, H20, H66, H69, H75, H81, H93, H94 и H109 в области VH заняты E, T, I, R, M, T, E, T, T и V соответственно. В некоторых антителах положения H1, H17, H20, H23, H28, H66, H69, H75, H81, H83, H93, H94 и H109 в области VH заняты E, T, I, K, T, R, M, T, E, R, T, T и V соответственно. В некоторых антителах положения H1, H17, H20, H23, H28, H43, H51, H54, H56, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, T, I, K, T, K, V, D, E, R, M, T, D, M, E, R, T, T, L и V соответственно. В некоторых антителах положения H1, H17, H20, H23, H28, H40, H43, H48, H51, H54, H56, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, T, I, K, T, A, K, M, V, D, E, R, M, T, D, M, E, R, T, T, L и V соответственно. В некоторых антителах положения H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H40, H42, H43, H51, H54, H56, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, K, T, I, K, R, A, G, K, V, D, E, R, M, T, D, M, E, R, T, T, L и V соответственно. В некоторых антителах положения H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H40, H42, H43, H51, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, K, T, I, K, R, A, G, K, V, R, M, T, D, M, E, R, T, T, L и V соответственно.

В некоторых антителах положения H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H69, H75, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, K, T, I, K, Q, G, K, R, M, T, M, E, R, T, T, L и V соответственно. В некоторых антителах переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127.

В некоторых антителах положения H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H69, H75, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, K, T, I, K, K, E, K, R, M, T, M, E, R, T, T, L и V, соответственно. В некоторых антителах переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128.

В некоторых антителах положения H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H69, H75, H80, H81, H82c, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, K, T, I, K, K, E, K, R, M, T, M, E, G, R, T, T, L и V соответственно.

В некоторых антителах положение H80 в области VH занято P. В некоторых антителах положение H80 в области VH занято D. В некоторых антителах положение H82c в области VH занято G. В некоторых антителах положение H82c в области VH занято D. В некоторых антителах положение H82 в области VH занято P. В некоторых антителах положение H80 в области VH занято G. В некоторых антителах положение H82 в области VH занято K. В некоторых антителах положение H82 в области VH занято R. В некоторых антителах положение H82 в области VH занято E. В некоторых антителах положение H82 в области VH занято N.

В некоторых антителах положение H79 в области VH занято D. В некоторых антителах положение H79 в области VH занято N. В некоторых антителах положение H79 в области VH занято G. В некоторых антителах положение H80 в области VH занято E. В некоторых антителах положение H80 в области VH занято G. В некоторых антителах положение H82c в области VH занято S. В некоторых антителах положение H79 в области VH занято Q. В некоторых антителах положение H82a в области VH занято G.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L7 занято S, L8 занято P, L15 занято P, а L100 занято Q. В некоторых антителах положения L7, L8, L15 и L100 заняты S, P, P и Q соответственно.

В некоторых антителах положение L66 в области VL занято G. В некоторых антителах положение L64 в области VL занято S.

В некоторых антителах положение L17 в области VL занято E. В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L11 занято L, L51 занято G, а L54 занято R.

В некоторых антителах положения L11, L51 и L54 заняты L, G и R, соответственно. В некоторых антителах положение L30 в области VL занято Y.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L3 занято V или Q, L7 занято A или S, L8 занято A или P, L9 занято F или L, L11 занято N или L, L15 занято L или P, L17 занято T или E, L18 занято S или P, L27b занято L, D, T или Q,











ID NO: 127, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168.

Некоторые такие антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального ЮС 12, где ЮС 12 является мышинным антителом, характеризующимся вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 7, и вариабельной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 11.

В некоторых таких антителах три CDR тяжелой цепи CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно), а три CDR легкой цепи CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно).

Некоторые антитела представляют собой 10С12 или его химерную, венериванную или гуманизованную форму. В некоторых антителах вариабельная область тяжелой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых антителах вариабельная область легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых антителах каждая из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с последовательностью зародышевой линии человека. Некоторые антитела представляют собой гуманизированные антитела.

Некоторые антитела представляют собой гуманизованное или химерное антитело 10С12, которое специфически связывается с человеческим тау, где 10С12 представляет собой мышинное антитело, характеризующееся зрелой вариабельной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и зрелой вариабельной областью легкой цепи SEQ ID NO: 11. Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 10С12, и гуманизованную зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 10С12. В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы Kabat, Chothia, композитному определению по Kabat/Chothia, AbM и Contact.

В некоторых антителах гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 10С12 согласно композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8-10), а гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 10С12 согласно композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 10С12 по Kabat (SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10), а гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 10С12 по Kabat (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 10С12 по Chothia (SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 10), а гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 10С12 по Chothia (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 10С12 по AbM (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 10), а гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 10С12 по AbM (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 10С12 по Contact (SEQ ID NO: 44-46), а гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 10С12 по Contact (SEQ ID NO: 47-49).

Например, антитело может представлять собой гуманизованное антитело, венериванное антитело или химерное антитело.

Некоторые такие антитела содержат гуманизованную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 214-215, и гуманизованную зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 216-217.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: Н24 занято А, Н48 занято I, Н67 занято А, Н69 занято М, Н93 занято Т, а Н94 занято Т. В некоторых антителах положения Н24, Н48, Н67, Н69, Н93 и Н94 заняты А, I, А, М, Т и Т,

соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H1 занято Q или E, H24 занято A, H48 занято I, H67 занято A, H69 занято M, H93 занято T, H94 занято T.

В некоторых антителах положения H24, H48, H67, H69, H93 и H94 заняты A, I, A, M, T и T, соответственно. В некоторых антителах положения H1, H24, H48, H67, H69, H93 и H94 заняты E, A, I, A, M, T и T соответственно.

В некоторых антителах положение L64 в области VL занято S.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L64 занято S, L104 занято V или L. В некоторых антителах положение L64 занято S. В некоторых антителах положения L64 и L104 в области VL заняты S и L соответственно.

Некоторые антитела содержат зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 214-215, и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 216-217. Некоторые антитела содержат зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 214-215, и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 216-217. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 214-215, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 216-217.

В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217.

Некоторые такие антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 12C4, где 12C4 является мышинным антителом, характеризующимся вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 219, и вариабельной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 11.

В некоторых таких антителах три CDR тяжелой цепи CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 220 и 10 соответственно), а три CDR легкой цепи CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно).

Некоторые антитела представляют собой 12C4 или его химерную, венеризованную или гуманизованную форму. В некоторых антителах вариабельная область тяжелой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых антителах вариабельная область легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых антителах каждая из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с последовательностью зародышевой линии человека. Некоторые антитела представляют собой гуманизированные антитела.

Некоторые антитела представляют собой гуманизированное или химерное антитело 12C4, которое специфически связывается с человеческим тау, где 12C4 представляет собой мышинное антитело, характеризующееся зрелой вариабельной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 219 и зрелой вариабельной областью легкой цепи SEQ ID NO: 11. Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 12C4, и гуманизованную зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 12C4. В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы Kabat, Chothia, композитному определению по Kabat/Chothia, AbM и Contact.

В некоторых антителах гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 12C4 согласно композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 220 и 10), а гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 12C4 согласно композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 12C4 по Kabat (SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 220 и SEQ ID NO: 10), а гуманизованная зрелая вариабельная об-

ласть легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 12C4 по Kabat (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 12C4 по Chothia (SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 10), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 12C4 по Chothia (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 12C4 по AbM (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 257 и SEQ ID NO: 10), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 12C4 по AbM (SEQ ID NO: 12-14). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 12C4 по Contact (SEQ ID NO: 44, 258 и 46), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 12C4 по Contact (SEQ ID NO: 47-49).

Например, антитело может представлять собой гуманизованное антитело, венированное антитело или химерное антитело.

Некоторые такие антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 221-222, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 223-224.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H1 занято Q или E, H48 занято M или I, H93 занято A или T, H94 занято R или T. В некоторых антителах положения H1, H48, H93 и H94 в области VH заняты E, I, T и T соответственно.

В некоторых антителах положения в области VL заняты указанной аминокислотой: L64 занято G или S, L104 занято V или L. В некоторых антителах положения L64 и L104 в области VL заняты S и L соответственно.

Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 221-222, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 223-224. Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 221-222, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 223-224. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 221-222, а зрелая переменная область легкой цепи имеет любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 223-224.

В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 221, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 221, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 224. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 224.

Некоторые такие антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 17C12, где 17C12 является мышинным антителом, характеризующимся переменной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 225, и переменной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 228.

В некоторых таких антителах три CDR тяжелой цепи CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 226, 227 и 10 соответственно), а три CDR легкой цепи CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 229, 230 и 231 соответственно).

Некоторые антитела представляют собой 17C12 или его химерную, венированную или гуманизованную форму. В некоторых антителах переменная область тяжелой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых антителах переменная область легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых антителах каждая из переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с последовательностью зародышевой линии человека. Некоторые антитела представляют собой гуманизированные антитела.

Некоторые антитела представляют собой гуманизованное или химерное антитело 17C12, которое специфически связывается с человеческим тау, где 17C12 представляет собой мышинное антитело, характеризующееся зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 225 и зрелой переменной об-

ластью легкой цепи SEQ ID NO: 228. Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 17C12, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 17C12. В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы Kabat, Chothia, композитному определению по Kabat/Chothia, AbM и Contact.

В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 17C12 согласно композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 226, 227 и 10), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 17C12 согласно композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 229-231). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 17C12 по Kabat (SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 227 и SEQ ID NO: 10), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 17C12 по Kabat (SEQ ID NO: 229-231). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 17C12 по Chothia (SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 10), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 17C12 по Chothia (SEQ ID NO: 229-231). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 17C12 по AbM (SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 260 и SEQ ID NO: 10), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 17C12 по AbM (SEQ ID NO: 229-231). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 17C12 по Contact (SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 261 и SEQ ID NO: 46), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 17C12 по Contact (SEQ ID NO: 262-264).

Например, антитело может представлять собой гуманизованное антитело, венеризованное антитело или химерное антитело.

Некоторые такие антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 232-233, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 234-235.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H2 занято I, H24 занято A, H48 занято I, H67 занято A, H69 занято M, H93 занято T, а H94 занято T. В некоторых антителах положения H2, H24, H48, H67, H69, H93 и H94 заняты E, A, I, A, M, T и T, соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H1 занято Q или E, H2 занято I, H24 занято A, H48 занято I, H67 занято A, H69 занято M, H93 занято T, H94 занято T, H108 занято T или L, H113 занято R или S. В некоторых антителах положения H2, H24, H48, H67, H69, H93 и H94 в области VH заняты E, A, I, A, M, T и T соответственно. В некоторых антителах положения H1, H2, H24, H48, H67, H69, H93, H94, H108 и H113 в области VH заняты E, I, A, I, A, M, T, T, L и S соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L2 занято V, а L36 занято L. В некоторых антителах положения L2 и L36 заняты V и L, соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L2 занято V, L36 занято L, L43 занято P или S. В некоторых антителах положения L2 и L36 в области VL заняты V и L соответственно. В некоторых антителах положения L2, L36 и L43 в области VL заняты V, L и S соответственно.

Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 232-233, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 234-235. Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 232-233, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 234-235. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 232-233, а зрелая переменная область легкой цепи имеет любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 234-235.

В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 233, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234. В некоторых

антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 233, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235.

Некоторые такие антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 14H3, где 14H3 является мышинным антителом, характеризующимся переменной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 240, и переменной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 244.

В некоторых таких антителах три CDR тяжелой цепи CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 241, 242 и 243 соответственно), за исключением того, что положение H35B может быть занято G или S, а три CDR легкой цепи CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 245, 246 и 247 соответственно). В некоторых антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 277.

Некоторые антитела представляют собой 14H3 или его химерную, венированную или гуманизованную форму. В некоторых антителах переменная область тяжелой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых антителах переменная область легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых антителах каждая из переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с последовательностью зародышевой линии человека. Некоторые антитела представляют собой гуманизованные антитела.

Некоторые антитела представляют собой гуманизованное или химерное антитело 14H3, которое специфически связывается с человеческим тау, где 14H3 представляет собой мышинное антитело, характеризующееся зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 240 и зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 244. Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 14H3, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 14H3. В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы Kabat, Chothia, композитному определению по Kabat/Chothia, AbM и Contact.

В некоторых антителах, где гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 14H3 согласно композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 241-243), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 14H3 согласно композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 245-247). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 14H3 по Kabat (SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 242 и SEQ ID NO: 243), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 14H3 по Kabat (SEQ ID NO: 245-247). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 14H3 по Chothia (SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 267 и SEQ ID NO: 243), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 14H3 по Chothia (SEQ ID NO: 245-247). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 14H3 по AbM (SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 268 и SEQ ID NO: 243), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 14H3 по AbM (SEQ ID NO: 245-247). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 14H3 по Contact (SEQ ID NO: 269-271), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 14H3 по Contact (SEQ ID NO: 272-274).

Например, антитело может представлять собой гуманизованное антитело, венированное антитело или химерное антитело.

Некоторые такие антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 248-249, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 250-251.

В некоторых антителах положение H35B в области VH занято S.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H35B занято S, H108 занято M или L, H113 занято L или S. В некоторых антителах положение H35B в области VH занято S. В некоторых антителах положения H35B, H108 и H113 в области VH заняты S, L и S соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L2 занято V, а L87 занято F. В некоторых антителах положения L2 и L87 заняты V и F соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L2 занято V, L7 занято T или S, L37 занято L или Q, L87 занято F, L100 занято G

или Q, L104 занято V или L. В некоторых антителах положения L2 и L87 в области VL заняты V и F соответственно. В некоторых антителах положения L2, L7, L37, L87, L100 и L104 в области VL заняты V, S, Q, F, Q и L соответственно.

Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 248-249, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 250-251. Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 248-249, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 250-251. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 248-249, а зрелая переменная область легкой цепи имеет любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 250-251.

В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 251. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 251.

Например, антитело может представлять собой химерное антитело. Например, антитело может представлять собой венеризованное антитело.

Антитело может представлять собой интактное антитело. Антитело может представлять собой связывающий фрагмент. В одном варианте осуществления связывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, фрагмент Fab или Fab<sup>2</sup>. Антитело может представлять собой фрагмент Fab или одноцепочечный Fv. Некоторые антитела имеют изотип IgG1 человека, а другие могут иметь изотип IgG2 или IgG4 человека. Некоторые антитела имеют зрелую переменную область легкой цепи, слитую с константной областью легкой цепи, и зрелую переменную область тяжелой цепи, слитую с константной областью тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи некоторых антител представляет собой мутантную форму константной области тяжелой цепи природного человеческого антитела, которая имеет пониженное связывание с рецептором Fc $\gamma$  по сравнению с константной областью тяжелой цепи природного человеческого антитела. В некоторых антителах константная область тяжелой цепи имеет изотип IgG1.

Некоторые антитела могут иметь по меньшей мере одну мутацию в константной области, например мутацию, которая снижает фиксацию или активацию комплемента константной областью, например, мутацию в одном или более из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 и 331 по нумерации ЕС. Некоторые антитела имеют аланин в положениях 318, 320 и 322. Некоторые антитела могут иметь чистоту не менее 95% мас./мас. Антитело может быть конъюгировано с терапевтическим, цитотоксическим, цитостатическим, нейротрофическим или нейрозащитным агентом.

В другом аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая любое из антител, раскрытых в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте в изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и/или легкую цепь любого из раскрытых в данном документе антител, рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, и клетку-хозяина, трансформированная рекомбинантным вектором экспрессии. Некоторые нуклеиновые кислоты имеют последовательность, включающую любую из SEQ ID NO: 38-39.

В другом аспекте в изобретении предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую зрелую переменную область тяжелой цепи и зрелую переменную область легкой цепи, функционально связанную с одной или более регуляторными последовательностями для осуществления экспрессии в клетке млекопитающего любого из раскрытых в данном документе антител, рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, клетку-хозяина, трансформированную рекомбинантным вектором экспрессии, и клетку-хозяина, трансформированную нуклеиновой кислотой. Некоторые нуклеиновые кислоты дополнительно кодируют константную область тяжелой цепи, слитую с зрелой переменной областью тяжелой цепи, и константную область легкой цепи, слитую со зрелой переменной областью легкой цепи. В некоторых векторах антитело представляет собой scFv. В некоторых векторах антитело представляет собой фрагмент Fab. В некоторых векторах одна или более регуляторных последовательностей включают одну или более из промотора, энхансера, сайта связывания рибосомы и сигнала терминации транскрипции. В некоторых векторах нуклеиновая кислота дополнительно кодирует сигнальные пептиды, слитые со зрелыми переменными областями тяжелой и легкой цепей. В

некоторых векторах нуклеиновая кислота оптимизирована по кодомам для экспрессии в клетке-хозяине. В некоторых векторах одна или более регуляторных последовательностей включают эукариотический промотор. В некоторых векторах нуклеиновая кислота дополнительно кодирует селективируемый ген.

В еще одном аспекте в изобретении предложены способы экспрессии антитела в клетке млекопитающего, включающие включение раскрытых в данном документе нуклеиновых кислот в геном трансгенного животного, в результате чего происходит экспрессия антитела.

В еще одном аспекте в изобретении предложены первый и второй векторы, соответственно включающие нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелую переменную область тяжелой цепи и зрелую переменную область легкой цепи, каждая из которых функционально связана с одной или более регуляторными последовательностями для осуществления экспрессии в клетке млекопитающего любого из раскрытых в данном документе антител, и клетке-хозяине, содержащей нуклеиновые кислоты. В некоторых первых и вторых векторах нуклеиновые кислоты, соответственно, дополнительно кодируют константную область тяжелой цепи, слитую со зрелой переменной областью тяжелой цепи, и константную область легкой цепи, слитую со зрелой переменной областью легкой цепи.

В еще одном аспекте в изобретении предложены способы экспрессии антитела в клетке млекопитающего, включающие включение любой из раскрытых в данном документе нуклеиновых кислот в геном трансгенного животного, в результате чего происходит экспрессия антитела.

В еще одном аспекте в изобретении предложены способы гуманизации любого нечеловеческого антитела, описанного в данном документе, например, мышиногo антитела 9F5, причем 9F5 характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 11, например, антитело мыши 10C12, где 10C12 характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 11; например, мышиногo антитела 2D11, причем 2D11 характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 11; например, антитело мыши 12C4, где 12C4 характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 219 и зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 11; например, мышиногo антитела 17C12, причем 17C12 характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 225 и зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 228; например, мышиногo антитела 14H3, причем 14H3 характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 240 и зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 244. Такие способы могут включать выбор одного или более акцепторных антител, определение аминокислотных остатков мышиногo антитела, которые необходимо сохранить; синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи мышиногo антитела и нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизованную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи мышиногo антитела, и экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизованного антитела.

Также предложены способы получения антител, таких как гуманизованные, химерные или венированные антитела, например, гуманизованные, химерные или венированные формы 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3. В таких способах клетки, трансформированные нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела, культивируются таким образом, что клетки секретируют антитело. Затем антитело может быть очищено из среды для культивирования клеток.

Клеточные линии, продуцирующие любое из раскрытых в данном документе антител, могут быть получены путем введения в клетки вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи антитела и селективируемого маркера, размножения клеток в условиях отбора клеток с увеличенным числом копий вектора, выделения единичных клеток из отобранных клеток и создания банков клеток, клонированных из отдельной клетки, отобранной на основе выхода антитела.

Некоторые клетки можно размножить в селективных условиях и провести скрининг клеточных линий, естественно экспрессирующих и выделяющих по меньшей мере  $100 \text{ мг/л}/10^6$  клеток/24 ч. Из отобранных клеток можно выделить отдельные клетки. Клетки, клонированные из отдельной клетки, можно затем поместить в банк. Отдельные клетки могут быть отобраны на основе желаемых свойств, таких как выход антитела. Примерами клеточных линий являются клеточные линии, экспрессирующие 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3.

В изобретении также предложены способы ингибирования или снижения агрегации тау у субъекта, имеющего или подверженного риску развития тау-опосредованного амилоидоза, включающие введение субъекту антитела, раскрытого в данном документе, по эффективной схеме, тем самым ингибируя или снижая агрегацию тау у субъекта. Примеры антител включают гуманизованные версии 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3.

Также предложены способы лечения или профилактики тау-ассоциированного заболевания у субъекта, включающие введение антитела, раскрытого в данном документе, по эффективной схеме, и тем самым обеспечивая лечение или профилактику заболевания. Примерами такого заболевания являются болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная тауопатия, постэнцефалитный паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Нимана-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобар-

ная дегенерация, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен, глобулярная глиальная тауопатия, боковой амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), глобулярная глиальная тауопатия (ГГТ), болезнь Паркинсона или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). В некоторых способах заболевание, связанное с тау, представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых способах пациент является носителем ApoE4.

Также предложены способы снижения aberrантной передачи тау, включающие введение антитела, раскрытого в данном документе, по эффективной схеме, и тем самым снижения передачу тау.

Также предложены способы индуцирования фагоцитоза тау, включающие введение антитела, раскрытого в данном документе, по эффективной схеме, и тем самым индуцируя фагоцитоз тау.

Также предложены способы ингибирования агрегации или осаждения тау, включающие введение эффективного антитела, раскрытого в данном документе, по эффективной схеме и тем самым ингибирование агрегации или осаждения тау.

Также предложены способы ингибирования образования клубков тау, включающие введение антитела, раскрытого в данном документе, по эффективной схеме.

В изобретении также предложен способ обнаружения отложений белка тау у субъекта, имеющего или подверженного риску заболевания, связанного с агрегацией или отложением тау, включающий введение субъекту антитела, раскрытого в данном документе, и обнаружение антитела, связанного с тау у субъекта. Примерами такого заболевания являются болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная тауопатия, постэнцефалитный паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Нимана-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен, глобулярная глиальная тауопатия, боковой амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), глобулярная глиальная тауопатия (ГГТ), болезнь Паркинсона или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). В некоторых вариантах осуществления антитело вводится путем внутривенной инъекции в организм субъекта. В некоторых вариантах осуществления антитело вводится непосредственно в мозг субъекта путем внутрочерепной инъекции или путем просверливания отверстия в черепе субъекта. В некоторых вариантах осуществления антитело является меченым. В некоторых вариантах осуществления антитело является меченым флуоресцентной меткой, парамагнитной меткой или радиоактивной меткой. В некоторых вариантах осуществления радиоактивная метка обнаруживается с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

В изобретении также предложен способ измерения эффективности лечения субъекта, получающего лечение от заболевания, ассоциированного с агрегацией или отложением тау, включающий измерение первого уровня отложений белка тау у субъекта до лечения путем введения субъекту антитела, раскрытого в данном документе, и обнаружения первого количества антитела, связанного с тау у субъекта, введения субъекту лечения, измерение второго уровня отложений белка тау у субъекта после лечения путем введения субъекту антитела и обнаружения антитела, связанного с тау у субъекта, причем снижение уровня отложений белка тау указывает на положительный ответ на лечение.

В изобретении также предложен способ измерения эффективности лечения субъекта, получающего лечение от заболевания, ассоциированного с агрегацией или отложением тау, включающий измерение первого уровня отложений белка тау у субъекта до лечения путем введения субъекту антитела, раскрытого в данном документе, и обнаружения первого количества антитела, связанного с тау у субъекта, введения субъекту лечения, измерение второго уровня отложений белка тау у субъекта после лечения путем введения субъекту антитела и обнаружения второго количества антитела, связанного с тау у субъекта, причем отсутствие изменений в уровне отложений белка тау или небольшое увеличение отложений белка тау указывает на положительный ответ на лечение.

В изобретении также предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с пептидом, состоящим из остатков (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56). В изобретении также предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с пептидом, состоящим из остатков QIVYKP (SEQ ID NO: 57). В изобретении также предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с пептидом, состоящим из остатков IVYKSP (SEQ ID NO: 58). В изобретении также предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с пептидом, состоящим из остатков EIVYKS (SEQ ID NO: 277).

В изобретении также предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с полипептидом SEQ ID NO: 1 на эпителии, включающем по меньшей мере один остаток в пределах 307-312 из SEQ ID NO: 1. Некоторые такие антитела связываются с эпителием в пределах остатков 307-312 SEQ ID NO: 1. В изобретении также предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с полипептидом SEQ ID NO: 1 на эпителии, включающем по меньшей

мере один остаток в пределах остатков 391-397 SEQ ID NO: 1. Некоторые такие антитела связываются с эпитопом в пределах остатков 391-397 SEQ ID NO: 1. В изобретении также предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с полипептидом SEQ ID NO: 1 на эпитопе, включающем по меньшей мере один остаток в пределах остатков 391-396 SEQ ID NO: 1. Некоторые такие антитела связываются с эпитопом в пределах остатков 391-396 SEQ ID NO: 1. В изобретении также предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с полипептидом SEQ ID NO: 1 на эпитопе, включающем по меньшей мере один остаток в пределах остатков 307-312 SEQ ID NO: 1 и по меньшей мере один остаток в пределах остатков 391-397 SEQ ID NO: 1. В изобретении также предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с полипептидом SEQ ID NO: 1 на эпитопе, включающем по меньшей мере один остаток в пределах остатков 307-312 SEQ ID NO: 1 и по меньшей мере один остаток в пределах остатков 391-396 SEQ ID NO: 1.

В изобретении также предложен способ лечения или профилактики тау-ассоциированного заболевания у субъекта, включающий введение иммуногена, включающего тау-пептид, содержащий до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, с которым специфически связывается антитело 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3, при этом пептид вызывает образование антител, специфически связывающихся с тау у субъекта. В некоторых таких способах пептид тау состоит из 4-7 смежных аминокислот из остатков 307-312 SEQ ID NO: 1 или из остатков 391-397 SEQ ID NO: 1 или из остатков 391-396 SEQ ID NO: 1. В некоторых таких способах тау-пептид состоит из остатков (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56). В некоторых таких способах тау-пептид состоит из остатков QIVYKP (SEQ ID NO: 57). В некоторых таких способах тау-пептид состоит из остатков EIVYKSP (SEQ ID NO: 58). В некоторых таких способах тау-пептид состоит из остатков EIVYKS (SEQ ID NO: 277). В некоторых таких способах тау-пептид присоединен к молекуле гетерологичного конъюгата.

В изобретении также предложен способ получения антитела, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56), включающий иммунизацию животного с применением тау или его фрагмента, и скрининг антител, которые специфически связываются с эпитопом. В некоторых таких способах животное иммунизируют человеческим тау, состоящим из 383 аминокислот (4R0N). В некоторых таких способах человеческий тау содержит мутацию P301S. В некоторых таких способах человеческий тау рекомбинантно помечен His-меткой на N-конце.

В некоторых таких способах скрининг выполняется в отношении пептидов из 15 аминокислот, содержащих QIVYKP (SEQ ID NO: 57), EIVYKSP (SEQ ID NO: 58) EIVYKS (SEQ ID NO: 277) или любой другой консенсусный мотив, представленный (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56). В некоторых таких способах пептиды содержат QIVYKP (SEQ ID NO: 57) или EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), или EIVYKS (SEQ ID NO: 277).

В некоторых таких способах животное иммунизируют фрагментом тау, содержащим пептид, представленный (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56), связанный с носителем. В некоторых таких способах пептид представляет собой QIVYKP (SEQ ID NO: 57) или EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), или EIVYKS (SEQ ID NO: 277).

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1A и 1B изображено выравнивание переменных областей тяжелой цепи мышинового антитела 9F5 (SEQ ID NO: 7) и гуманизованных версий антитела 9F5 (hu9F5VHv1, hu9F5VHv2, hu9F5VHv3, hu9F5VHv4, hu9F5VHv5, hu9F5VHv6, hu9F5VHv7 и hu9F5VHv8) с последовательностью варибельной области тяжелой цепи зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) с последовательностью варибельной области акцепторной тяжелой цепи человека AAN16432-VH\_huFrwk (AAN16432\_H; SEQ ID NO: 31) и с последовательностью варибельной области акцепторной тяжелой цепи человека 2RCS-VH\_huFrwk (2RCSH; SEQ ID NO: 32). hu9F5VHv1 представляет собой SEQ ID NO: 15, hu9F5VHv2 представляет собой SEQ ID NO: 16, hu9F5VHv3 представляет собой SEQ ID NO: 17, hu9F5VHv4 представляет собой SEQ ID NO: 18, hu9F5VHv5 представляет собой SEQ ID NO: 19, hu9F5VHv6 представляет собой SEQ ID NO: 20, hu9F5VHv7 представляет собой SEQ ID NO: 21, и hu9F5VHv8 представляет собой SEQ ID NO: 22. CDR VH мышинового 9F5, согласно композитному определению по Kabat/Chothia, выделены жирным шрифтом.

На фиг. 2A и 2B изображено выравнивание переменных областей тяжелой цепи мышинового антитела 9F5 (SEQ ID NO: 11) и гуманизованных версий антитела 9F5 (hu9F5VLv1, hu9F5VLv2, hu9F5VLv3, hu9F5VLv4, hu9F5VLv5, hu9F5VLv6 и hu9F5VLv7) с последовательностью варибельной области легкой цепи зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (IGKV2-28\*01 IGKJ2\*01; SEQ ID NO: 37) с акцептором человека CAB51297-VL\_huFrwk (CAB51297L; SEQ ID NO: 35) и с акцептором человека 1911357B-VL\_huFrwk (1911357B\_L; SEQ ID NO: 36). hu9F5VLv1 представляет собой SEQ ID NO: 23, hu9F5VLv2 представляет собой SEQ ID NO: 24, hu9F5VLv3 представляет собой SEQ ID NO: 25, hu9F5VLv4 представляет собой SEQ ID NO: 26, hu9F5VLv5 представляет собой SEQ ID NO: 27, hu9F5VLv6 представляет собой SEQ ID NO: 28, и hu9F5VLv7 представляет собой SEQ ID NO: 29. CDR VL мышинового 9F5, согласно определению Kabat, выделены жирным шрифтом.

На фиг. 3 изображены результаты анализа, показывающего, что мышинное антитело 9F5 блокирует интернализацию тау нейронами.

На фиг. 4А и 4В изображено выравнивание переменных областей тяжелой цепи мышинного антитела 9F5 (SEQ ID NO: 7) и гуманизированных версий антитела 9F5 (hu9F5VHv1, hu9F5VHv2, hu9F5VHv3, hu9F5VHv4, hu9F5VHv5, hu9F5VHv6, hu9F5VHv7, hu9F5VHv8, hu9F5VHv9 и hu9F5VHv10) с последовательностью переменной области тяжелой цепи зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) с последовательностью переменной области акцепторной тяжелой цепи человека AAN16432-VH\_huFrwk (AAN16432\_H; SEQ ID NO: 31) и с последовательностью переменной области акцепторной тяжелой цепи человека 2RCS-VH\_huFrwk (2RCS\_H; SEQ ID NO: 32). hu9F5VHv1 представляет собой SEQ ID NO: 15, hu9F5VHv2 представляет собой SEQ ID NO: 16, hu9F5VHv3 представляет собой SEQ ID NO: 17, hu9F5VHv4 представляет собой SEQ ID NO: 18, hu9F5VHv5 представляет собой SEQ ID NO: 19, hu9F5VHv6 представляет собой SEQ ID NO: 20, и hu9F5VHv7 представляет собой SEQ ID NO: 21, hu9F5VHv8 представляет собой SEQ ID NO: 22, hu9F5VHv9 представляет собой SEQ ID NO: 127, и hu9F5VHv10 представляет собой SEQ ID NO: 128. CDR VH мышинного 9F5, согласно композитному определению по Kabat/Chothia, выделены жирным шрифтом. Остатки, идентичные остаткам VH мышинного 9F5, обозначены «.»

На фиг. 5А и 5В изображено выравнивание переменных областей тяжелой цепи мышинного антитела 9F5 (SEQ ID NO: 11) и гуманизированных версий антитела 9F5 (hu9F5VLv1, hu9F5VLv2, hu9F5VLv3, hu9F5VLv4, hu9F5VLv5, hu9F5VLv6, hu9F5VLv7, hu9F5VLv8 и hu9F5VLv9) с последовательностью переменной области легкой цепи зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (IGKV2-28\*01\_IGKJ2\*01; SEQ ID NO: 37) с акцептором человека CAB51297-VL\_huFrwk (CAB51297\_L; SEQ ID NO: 35) и с акцептором человека 1911357B-VL\_huFrwk (1911357B\_L; SEQ ID NO: 36). hu9F5VLv1 представляет собой SEQ ID NO: 23, hu9F5VLv2 представляет собой SEQ ID NO: 24, hu9F5VLv3 представляет собой SEQ ID NO: 25, hu9F5VLv4 представляет собой SEQ ID NO: 26, hu9F5VLv5 представляет собой SEQ ID NO: 27, hu9F5VLv6 представляет собой SEQ ID NO: 28, hu9F5VLv7 представляет собой SEQ ID NO: 2, hu9F5VLv8 представляет собой SEQ ID NO: 130 и hu9F5VLv9 представляет собой SEQ ID NO: 131. CDR VL мышинного 9F5, согласно определению Kabat, выделены жирным шрифтом. Остатки, идентичные остаткам VL мышинного 9F5, обозначены «.»

На фиг. 6А, 6В и 6С изображено выравнивание переменной области легкой цепи hu9F5VLv8 с переменными областями легкой цепи гуманизированных вариантов антитела 9F5: hu9F5VLv8\_DIM1 (SEQ ID NO: 132), hu9F5VLv8\_DIM2 (SEQ ID NO: 133), hu9F5VLv8\_DIM3 (SEQ ID NO: 134), hu9F5VLv8\_DIM4 (SEQ ID NO: 135), hu9F5VLv8\_DIM5 (SEQ ID NO: 136), hu9F5VLv8\_DIM6 (SEQ ID NO: 137), hu9F5VLv8\_DIM7 (SEQ ID NO: 138), hu9F5VLv8\_DIM8 (SEQ ID NO: 139), hu9F5VLv8\_DIM9 (SEQ ID NO: 140), hu9F5VLv8\_DIM10 (SEQ ID NO: 141), hu9F5VLv8\_DIM11 (SEQ ID NO: 142), hu9F5VLv8\_DIM12 (SEQ ID NO: 143), hu9F5VLv8\_DIM13 (SEQ ID NO: 144), hu9F5VLv8\_DIM14 (SEQ ID NO: 145), hu9F5VLv8\_DIM15 (SEQ ID NO: 146), hu9F5VLv8\_DIM16 (SEQ ID NO: 147), hu9F5VLv8\_DIM17 (SEQ ID NO: 148), hu9F5VLv8\_DIM18 (SEQ ID NO: 149), hu9F5VLv8\_DIM19 (SEQ ID NO: 150), hu9F5VLv8\_DIM20 (SEQ ID NO: 151), hu9F5VLv8\_DIM21 (SEQ ID NO: 152), hu9F5VLv8\_DIM22 (SEQ ID NO: 153), hu9F5VLv8\_DIM23 (SEQ ID NO: 154), hu9F5VLv8\_DIM24 (SEQ ID NO: 155), hu9F5VLv8\_DIM25 (SEQ ID NO: 156), hu9F5VLv8\_DIM26 (SEQ ID NO: 157), hu9F5VLv9\_DIM1 (SEQ ID NO: 162), hu9F5VLv9\_DIM2 (SEQ ID NO: 163), hu9F5VLv9\_DIM4 (SEQ ID NO: 164), hu9F5VLv9\_DIM5 (SEQ ID NO: 165), hu9F5VLv9\_DIM8 (SEQ ID NO: 166), hu9F5VLv9\_DIM10 (SEQ ID NO: 167), hu9F5VLv9\_DIM11 (SEQ ID NO: 168), hu9F5VLv9\_DIM13 (SEQ ID NO: 169), hu9F5VLv9\_DIM19 (SEQ ID NO: 170), hu9F5VLv9\_DIM20 (SEQ ID NO: 171), hu9F5VLv8\_DIM27 (SEQ ID NO: 158), hu9F5VLv8\_DIM28 (SEQ ID NO: 159), hu9F5VLv8\_DIM29 (SEQ ID NO: 160), hu9F5VLv8\_DIM30 (SEQ ID NO: 161). CDR hu9F5VLv8, согласно определению Kabat, выделены жирным шрифтом.

На фиг. 7 изображено выравнивание переменных областей тяжелой цепи мышинного антитела 10C12 (SEQ ID NO: 7, обозначено m10C12 VH на фиг. 7) и гуманизированных вариантов антитела 10C12 (hu10C12VHv1 и hu10C12VHv2) с последовательностью переменной области тяжелой цепи зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) и с последовательностью переменной области акцепторной тяжелой цепи человека CAC20421 VH (SEQ ID NO: 218). hu10C12VHv1 представляет собой SEQ ID NO: 214 и hu10C12VHv2 представляет собой SEQ ID NO: 215. CDR VH мышинного 10C12, согласно композитному определению по Kabat/Chothia, выделены жирным шрифтом.

На фиг. 8 изображено выравнивание переменных областей легкой цепи мышинного 10C12 (SEQ ID NO: 11) и гуманизированных вариантов антитела 10C12 (hu10C12VLv1 и hu10C12VLv2) с последовательностью переменной области легкой цепи зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) и с акцептором человека CAB51297-VL\_huFrwk (SEQ ID NO: 35). hu10C12VLv1 представляет собой SEQ ID NO: 216 и hu10C12VLv2 представляет собой SEQ ID NO: 217. CDR VL мышинного 10C12, согласно определению Kabat, выделены жирным шрифтом.

На фиг. 9 изображено выравнивание переменных областей тяжелой цепи мышинного антитела 12C4 (SEQ ID NO: 219) и гуманизированных вариантов антитела 12C4 (hu12C4VHv1 и hu12C4VHv2) с последовательностью переменной области тяжелой цепи зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) и с последовательностью переменной области акцепторной тяжелой цепи человека

CAC20421 VH (SEQ ID NO: 218). hu12C4VHv1 представляет собой SEQ ID NO: 221 и hu12C4VHv2 представляет собой SEQ ID NO: 222. CDR VH мышиноного 12C4, согласно композитному определению по Kabat/Chothia, выделены жирным шрифтом.

На фиг. 10 изображено выравнивание переменных областей легкой цепи мышиноного антитела 12C4 (SEQ ID NO: 11) и гуманизованных вариантов антитела 12C4 (hu12C4VLv1 и huvVLv2) с последовательностью переменной области легкой цепи зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) и с акцептором человека CAB51297 (SEQ ID NO: 35). hu12C4VLv1 представляет собой SEQ ID NO: 223 и hu12C4VLv2 представляет собой SEQ ID NO: 224. CDR VL мышиноного 12C4 согласно определению Kabat выделены жирным шрифтом.

На фиг. 11 изображено выравнивание переменных областей тяжелой цепи мышиноного антитела 17C12 (SEQ ID NO: 225) и гуманизованных вариантов антитела 17C12 (hu17C12VHv1 и hu17C12VHv2) с последовательностью переменной области тяжелой цепи зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) и с последовательностью переменной области акцепторной тяжелой цепи человека CAC20421 VH (SEQ ID NO: 218). hu17C12VHv1 представляет собой SEQ ID NO: 232 и hu17C12VHv2 представляет собой SEQ ID NO: 233. CDR VH мышиноного 17C12 согласно композитному определению по Kabat/Chothia выделены жирным шрифтом.

На фиг. 12 изображено выравнивание переменных областей легкой цепи мышиноного антитела 17C12 (SEQ ID NO: 228) и гуманизованных вариантов антитела 17C12 (hu17C12VLv1 и hu17C12VLv2) с последовательностью переменной области легкой цепи зародышевой линии человека IGKV2-29\*02 и IGKJ4\*01 (SEQ ID NO: 239) и с акцептором человека QDO16713 VL (SEQ ID NO: 238). hu17C12VLv1 представляет собой SEQ ID NO: 234 и hu17C12VLv2 представляет собой SEQ ID NO: 235. CDR VL мышиноного 17C12 согласно определению Kabat выделены жирным шрифтом.

На фиг. 13 изображено выравнивание переменных областей тяжелой цепи мышиноного антитела 14H3 (SEQ ID NO: 240) и гуманизованных вариантов антитела 14H3 (hu14H3VHv1 и hu14H3VHv2) с последовательностью переменной области тяжелой цепи зародышевой линии человека IGHV2-70\*04 и IGHJ4\*01 (SEQ ID NO: 254) и с последовательностью переменной области акцепторной тяжелой цепи человека QDJ57937VH hFwK (SEQ ID NO: 253). hu14H3VHv1 представляет собой SEQ ID NO: 248 и hu14H3VHv2 представляет собой SEQ ID NO: 249. CDR VH мышиноного 14H3 согласно композитному определению по Kabat/Chothia выделены жирным шрифтом.

На фиг. 14 изображено выравнивание переменных областей легкой цепи мышиноного антитела 14H3 (SEQ ID NO: 244) и гуманизованных вариантов антитела 14H3 (hu14H3VLv1 и hu14H3VLv2) с последовательностью переменной области легкой цепи зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (IGKV2-28\*01 IGKJ2\*01; SEQ ID NO: 37) и с акцептором человека ABC66914VL\_hFwK (SEQ ID NO: 256). hu14H3VLv1 представляет собой SEQ ID NO: 250 и hu14H3VLv2 представляет собой SEQ ID NO: 251. CDR VL мышиноного 14H3 согласно определению Kabat выделены жирным шрифтом.

На фиг. 15 изображены результаты анализа, показывающего, что мышиноное антитело 10C12, мышиноное антитело 12C4, мышиноное антитело 2D11, мышиноное антитело 17C12, мышиноное антитело 14H3 и мышиноное антитело 9F5 блокируют интернализацию тау нейронами.

На фиг. 16 изображены результаты анализа, показывающего, что мышиноное антитело 10C12, мышиноное антитело 12C4, мышиноное антитело 2D11 и мышиноное антитело 9F5 предотвращают токсичность тау в первичных нейронах (жизнеспособность нейронов).

На фиг. 17 изображены результаты анализа, показывающего, что мышиноное антитело 10C12, мышиноное антитело 12C4, мышиноное антитело 2D11 и мышиноное антитело 9F5 предотвращают токсичность тау в первичных нейронах (высвобождение ЛДГ).

На фиг. 18 изображены результаты анализа методом вестерн-блоттинга, показывающие, что мышиноное антитело 10C12, мышиноное антитело 12C4, мышиноное антитело 2D11, мышиноное антитело 17C12, мышиноное антитело 14H3 и мышиноное антитело 9F5 обнаруживают тау в образцах из головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера.

На фиг. 19 изображены результаты анализа иммунопреципитации с использованием мышиноного антитела 10C12, мышиноного антитела 12C4, мышиноного антитела 2D11, мышиноного антитела 17C12, мышиноного антитела 14H3 и мышиноного антитела 9F5, и образца из головного мозга пациента с болезнью Альцгеймера.

На фиг. 20 изображены результаты анализа для измерения способности гуманизованных вариантов 9F5 противостоять агрегации, вызванной стрессом при перемешивании.

На фиг. 21 изображены результаты анализа для измерения способности гуманизованных вариантов 9F5 выдерживать воздействие низкого pH.

На фиг. 22 изображены результаты анализа для измерения способности гуманизованных вариантов 9F5 к агрегации в смоделированных условиях высокой концентрации.

На фиг. 23A-F изображены результаты иммуногистохимических анализов с использованием контроля, мышиноного 2D11, мышиноного 9F5, мышиноного 12C4, мышиноного 14H3 и мышиноного 17C12.

На фиг. 24 показано выравнивание переменных областей тяжелой цепи мышиноного антитела 9F5 (SEQ ID NO: 7), мышиноного антитела 10C12 (SEQ ID NO: 7), мышиноного антитела 2D11 (SEQ ID NO: 7),

мышинного антитела 12C4 (SEQ ID NO: 219), мышинного антитела 14H3 (SEQ ID NO: 240) и мышинного антитела 17C12 (SEQ ID NO: 225). CDR VH мышинного 9F5 согласно композитному определению по Kabat/Chothia выделены жирным шрифтом.

На фиг. 25 показано выравнивание переменных областей легкой цепи мышинного антитела 9F5 (SEQ ID NO: 11), мышинного антитела 10C12 (SEQ ID NO: 11), мышинного антитела 2D11 (SEQ ID NO: 11), мышинного антитела 12C4 (SEQ ID NO: 11), мышинного антитела 14H3 (SEQ ID NO: 244) и мышинного антитела 17C12 (SEQ ID NO: 228). CDR VL мышинного 9F5 согласно определению Kabat выделены жирным шрифтом.

#### **Краткое описание последовательностей**

В SEQ ID NO: 1 представлена аминокислотная последовательность изоформы человеческого тау (Swiss-Prot P10636-8).

В SEQ ID NO: 2 представлена аминокислотная последовательность изоформы человеческого тау (Swiss-Prot P10636-7).

В SEQ ID NO: 3 представлена аминокислотная последовательность изоформы человеческого тау (Swiss-Prot P10636-6), (человеческий тау 4R0N).

В SEQ ID NO: 4 представлена аминокислотная последовательность изоформы человеческого тау (Swiss-Prot P10636-5).

В SEQ ID NO: 5 представлена аминокислотная последовательность изоформы человеческого тау (Swiss-Prot P10636-4).

В SEQ ID NO: 6 представлена аминокислотная последовательность изоформы человеческого тау (Swiss-Prot P10636-2).

В SEQ ID NO: 7 представлена аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи мышинного антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 8 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat/Chothia мышинного антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 9 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по Kabat мышинного антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 10 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 по Kabat мышинного антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 11 представлена аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи мышинного антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 12 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 по Kabat мышинного антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 13 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 по Kabat мышинного антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 14 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 по Kabat мышинного антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 15 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной тяжелой цепи hu9F5VHv1.

В SEQ ID NO: 16 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной тяжелой цепи hu9F5VHv2.

В SEQ ID NO: 17 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной тяжелой цепи hu9F5VHv3.

В SEQ ID NO: 18 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной тяжелой цепи hu9F5VHv4.

В SEQ ID NO: 19 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной легкой цепи hu9F5VHv5.

В SEQ ID NO: 20 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной тяжелой цепи hu9F5VHv6.

В SEQ ID NO: 21 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной тяжелой цепи hu9F5VHv7.

В SEQ ID NO: 22 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной тяжелой цепи hu9F5VHv8.

В SEQ ID NO: 23 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной легкой цепи hu9F5VLv1.

В SEQ ID NO: 24 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной легкой цепи hu9F5VLv2.

В SEQ ID NO: 25 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной легкой цепи hu9F5VLv3.

В SEQ ID NO: 26 представлена аминокислотная последовательность переменной области гуманизированной легкой цепи hu9F5VLv4.

В SEQ ID NO: 27 представлена аминокислотная последовательность переменной области легкой

цепи гуманизованного антитела hu9F5VLv5 9F5.

В SEQ ID NO: 28 представлена аминокислотная последовательность варибельной области гуманизованной легкой цепи hu9F5VLv6.

В SEQ ID NO: 29 представлена аминокислотная последовательность варибельной области гуманизованной легкой цепи hu9F5VLv7.

В SEQ ID NO: 30 представлена аминокислотная последовательность структурной модели варибельной области тяжелой цепи PDB. № 50BF-VH\_mSt.

В SEQ ID NO: 31 представлена аминокислотная последовательность акцептора варибельной области тяжелой цепи, номер доступа в GenBank AAN16432-VH\_huFrwk.

В SEQ ID NO: 32 представлена аминокислотная последовательность акцептора варибельной области тяжелой цепи PDB № 2RCS-VH\_huFrwk.

В SEQ ID NO: 33 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи зародышевой линии IMGT № IGHV1-69-2\*01.

В SEQ ID NO: 34 представлена аминокислотная последовательность структурной модели варибельной области легкой цепи PDB № 50BF-VL\_mSt.

В SEQ ID NO: 35 представлена аминокислотная последовательность акцептора варибельной области легкой цепи, номер доступа в GenBank CAB51297-VL\_huFrwk.

В SEQ ID NO: 36 представлена аминокислотная последовательность акцептора варибельной области легкой цепи, номер доступа в GenBank 1911357B-VL\_huFrwk.

В SEQ ID NO: 37 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи зародышевой линии IMGT № IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01.

В SEQ ID NO: 38 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельную область тяжелой цепи мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 39 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельную область легкой цепи мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 40 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 по Kabat мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 41 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 по Chothia мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 42 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по Chothia мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 43 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по AbM мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 44 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 по Contact мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 45 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по Contact мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 46 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 по Contact мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 47 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 по Contact мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 48 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 по Contact мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 49 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 по Contact мышинового антитела 9F5.

В SEQ ID NO: 50 представлена аминокислотная последовательность альтернативной CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia гуманизованного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VHv4, hu9F5VHv5 и hu9F5VHv6).

В SEQ ID NO: 51 представлена аминокислотная последовательность альтернативной CDR-H2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VHv5, hu9F5VHv6 и hu9F5VHv7).

В SEQ ID NO: 52 представлена аминокислотная последовательность альтернативной CDR-H2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VHv8).

В SEQ ID NO: 53 представлена аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VLv5 и hu9F5VLv6).

В SEQ ID NO: 54 представлена аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VLv7).

SEQ ID NO: 55 представлена аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VLv4, hu9F5VLv5, hu9F5VLv6, hu9F5VLv7, hu9F5VLv8\_DIM2, hu9F5VLv8\_DIM4, hu9F5VLv8\_DIM5, hu9F5VLv8\_DIM6, hu9F5VLv8\_DIM11, hu9F5VLv8\_DIM12, hu9F5VLv8\_DIM13, hu9F5VLv8\_DIM18, hu9F5VLv8\_DIM27, hu9F5VLv8\_DIM28, hu9F5VLv9\_DIM2, hu9F5VLv9\_DIM4, hu9F5VLv9\_DIM5, hu9F5VLv9\_DIM11 и hu9F5VLv9\_DIM13).

В SEQ ID NO: 56 представлена аминокислотная последовательность эпитопа антитела 9F5.













В SEQ ID NO: 215 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи hu10C12VHv2.

В SEQ ID NO: 216 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи hu10C12VLv1.

В SEQ ID NO: 217 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи hu10C12VLv2.

В SEQ ID NO: 218 представлена аминокислотная последовательность акцептора вариабельной области тяжелой цепи CAC20421-VH\_huFrwk.

В SEQ ID NO: 219 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышинового антитела 12C4.

В SEQ ID NO: 220 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по Kabat мышинового антитела 12C4.

В SEQ ID NO: 221 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи hu12C4VHv1.

В SEQ ID NO: 222 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи hu12C4VHv2.

В SEQ ID NO: 223 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи hu12C4VLv1.

В SEQ ID NO: 224 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи hu12C4VLv2.

В SEQ ID NO: 225 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 226 представлена аминокислотная последовательность CDR H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 227 представлена аминокислотная последовательность CDR H2 по Kabat мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 228 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 229 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 по Kabat мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 230 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 по Kabat мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 231 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 по Kabat мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 232 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи hu17C12VHv1.

В SEQ ID NO: 233 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи hu17C12VHv2.

В SEQ ID NO: 234 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи hu17C12VLv1.

В SEQ ID NO: 235 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи hu17C12VLv2.

В SEQ ID NO: 236 представлена аминокислотная последовательность структурной модели вариабельной области тяжелой цепи 3PP3-VH\_mSt.

В SEQ ID NO: 237 представлена аминокислотная последовательность структурной модели вариабельной области легкой цепи 3PP3-VL\_mSt.

В SEQ ID NO: 238 представлена аминокислотная последовательность акцептора вариабельной области легкой цепи QDO16713-VL\_huFrwk.

В SEQ ID NO: 239 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи зародышевой линии IGKV2-29\*02 и IGKJ4\*01.

В SEQ ID NO: 240 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 241 представлена аминокислотная последовательность CDR H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 242 представлена аминокислотная последовательность CDR H2 по Kabat мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 243 представлена аминокислотная последовательность CDR H3 по Kabat мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 244 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 245 представлена аминокислотная последовательность CDR L1 по Kabat мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 246 представлена аминокислотная последовательность CDR L2 по Kabat мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 247 представлена аминокислотная последовательность CDR L3 по Kabat мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 248 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи hu14H3VHv1.

В SEQ ID NO: 249 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи hu14H3VHv2.

В SEQ ID NO: 250 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи hu14H3VLv1.

В SEQ ID NO: 251 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи hu14H3VLv2.

В SEQ ID NO: 252 представлена аминокислотная последовательность структурной модели вариабельной области тяжелой цепи 2VQ1-VH\_mSt.

В SEQ ID NO: 253 представлена аминокислотная последовательность акцептора вариабельной области тяжелой цепи QDJ57937-VH\_huFrwk.

В SEQ ID NO: 254 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи зародышевой линии IGHV1-70\*04 и IGHJ4\*01.

В SEQ ID NO: 255 представлена аминокислотная последовательность структурной модели вариабельной области легкой цепи 2VQ1-VL\_mSt.

В SEQ ID NO: 256 представлена аминокислотная последовательность акцептора вариабельной области легкой цепи ABC66914-VL\_huFrwk.

В SEQ ID NO: 257 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по AbM мышинового антитела 12C4.

В SEQ ID NO: 258 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по Contact мышинового антитела 12C4.

В SEQ ID NO: 259 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 по Chothia мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 260 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по AbM мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 261 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по Contact мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 262 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 по Contact мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 263 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 по Contact мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 264 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 по Contact мышинового антитела 17C12.

В SEQ ID NO: 265 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 по Kabat мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 266 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 по Chothia мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 267 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по Chothia мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 268 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по AbM мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 269 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 по Contact мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 270 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 по Contact мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 271 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 по Contact мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 272 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 по Contact мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 273 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 по Contact мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 274 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 по Contact мышинового антитела 14H3.

В SEQ ID NO: 275 представлена аминокислотная последовательность альтернативной CDR H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia гуманизированного антитела 14H3 (присутствует в hu14H3VHv1 и hu14H3VHv2).

В SEQ ID NO: 276 представлена аминокислотная последовательность консенсусного мотива пепти-

да, связываемого антителом 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 и 14H3.

В SEQ ID NO: 277 представлена аминокислотная последовательность консенсусного мотива пептида, связываемого антителом 2D11.

### Определения

Моноклональные антитела или другие биологические соединения обычно предоставляются в выделенной форме. Это означает, что антитело или другое биологическое соединение обычно имеет чистоту не менее 50% мас./мас., от интерферирующих белков и других загрязняющих веществ, возникающих в результате его производства или очистки, но не исключает возможности того, что моноклональное антитело комбинируется с избытком фармацевтически приемлемого носителя или другой несущей среды, предназначенной для облегчения его применения. Иногда моноклональные антитела являются по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% мас./мас., чистыми от интерферирующих белков и загрязняющих веществ, полученных при производстве или очистке. Часто выделенное моноклональное антитело или другое биологическое соединение является преобладающим видом макромолекул, остающимся после его очистки.

Специфическое связывание антитела с его антигеном-мишенью означает аффинность и/или авидность по меньшей мере  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  или  $10^{12}$   $M^{-1}$ . Специфическое связывание заметно выше по величине и отличается от неспецифического связывания, происходящего по меньшей мере с одной неродственной мишенью. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между конкретными функциональными группами или определенного пространственного соответствия (например, типа замка и ключа), тогда как неспецифическое связывание обычно является результатом действия сил Ван-дер-Ваальса. Однако специфическое связывание не обязательно означает, что антитело связывает одну и только одну мишень.

Основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных 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. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию.

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 легкой и тяжелой цепях вариабельные и константные области соединены областью "J" из около 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает область "D" из около 10 или более аминокислот. См. в целом, *Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 (включена в данный документ в полном объеме для всех цепей).

Вариабельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (также называемая в данном документе "вариабельным доменом легкой цепи" ("доменом VL") или "вариабельным доменом тяжелой цепи" ("доменом VH")), соответственно) состоит из "каркасной" области, прерванной тремя "определяющими комплементарность областями" или "CDR". Каркасные области служат для выравнивания CDR для специфического связывания с эпитопом антигена. CDR включают аминокислотные остатки антитела, которые в первую очередь отвечают за связывание антигена. От аминоконца до карбоксильного конца оба домена VL и VH содержат следующие каркасные области (FR) и CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR 1, 2 и 3 домена VL также упоминаются в данном документе, соответственно, как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; CDR 1, 2 и 3 домена VH также упоминаются в данном документе, соответственно, как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. Когда в заявке раскрывается последовательность VL с R в качестве C-концевого остатка, R альтернативно можно рассматривать как N-концевой остаток константной области легкой цепи. Таким образом, заявку также следует понимать как раскрытие последовательности VL без C-концевого R.

Отнесение аминокислот к каждому домену VL и VH соответствует любому традиционному определению CDR. Традиционные определения включают определение по Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 и 1991)), определение по Chothia (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia et al, *Nature* 342:878-883, 1989); композит CDR по Chothia Kabat, в котором CDR-H1 представляет собой композит CDR по Chothia и Kabat; определение по AbM, используемое программой моделирования антител Oxford Molecular; и контактное определение по Martin et al (bioinfo.org.uk/abs) (см. табл. 1). Kabat предлагает широко используемую нумерацию (нумерацию по Kabat), в которой соответствующим остаткам между разными тяжелыми цепями или между разными легкими цепями присваивается один и тот же номер. Когда говорят, что антитело содержит CDR согласно определенному определению CDR (например, по Kabat), это определение указывает на минимальное количество остатков CDR, присутствующих в антителе (т.е. CDR по Kabat). Это не исключает, что присутствуют и другие остатки, подпадающие под другое традиционное определение CDR, но

не входящие в указанное определение. Например, антитело, содержащее CDR, определенные Кабатом, включает среди других возможностей антитело, в котором CDR содержат остатки CDR по Kabat и не содержат других остатков CDR, и антитело, в котором CDR H1 соответствует композитному определению CDR H1 по Chothia-Kabat и другие CDR содержат остатки CDR по Kabat и не содержат дополнительных остатков CDR на основе других определений.

Таблица 1. Традиционные определения CDR с использованием нумерации по Kabat

Петля	Kabat	Chothia	Композитное определение по Chothia и Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

\*CDR-H1 по Chothia может заканчиваться на H32, H33 или H34 (в зависимости от длины петли). Это связано с тем, что схема нумерации по Kabat помещает вставки дополнительных остатков в положения 35A и 35B, тогда как нумерация по Chothia помещает их в положения 31A и 31B. Если нет ни H35A, ни H35B (нумерация по Kabat), петля CDR-H1 по Chothia заканчивается на H32. Если присутствует только H35A, она заканчивается на H33. Если присутствуют как H35A, так и H35B, она заканчивается на H34.

Термин "антитело" включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены, за специфическое связывание с мишенью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Dab, нанотела и Fv. Фрагменты можно получить методами рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим разделением интактных иммуноглобулинов. Термин "антитело" также включает биспецифическое антитело и/или гуманизованное антитело. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелой/легкой цепей и два разных сайта связывания (см., например, Songvilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol, 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol, 148:1547-53 (1992)). В некоторых биспецифических антителах две разные пары тяжелой/легкой цепи включают гуманизованные пары тяжелая цепь/легкая цепь 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3 и пару тяжелая цепь/легкая цепь, специфичные для другого эпитопа на тау, чем которые связаны 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3.

В некоторых биспецифических антителах одна пара тяжелая цепь/легкая цепь представляет собой гуманизованное антитело 9F5, гуманизованное антитело 10C12, гуманизованное антитело 2D11, гуманизованное антитело 12C4, гуманизованное антитело 17C12 или гуманизованное антитело 14H3, как дополнительно раскрыто ниже, а другая тяжелая цепь/пара легкой цепи происходит от антитела, которое связывается с рецептором, экспрессируемым на гематоэнцефалическом барьере, таким как рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF), рецептор лептина, рецептор липопротеина или рецептор трансферрина (Friden et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4771-4775, 1991; Friden et al., Science 259:373-377, 1993). Такое биспецифическое антитело может переноситься через гематоэнцефалический барьер посредством рецептор-опосредованного транцитоза. Захват биспецифического антитела головным мозгом может быть дополнительно усилен путем конструирования биспецифического антитела для снижения его аффинности к рецептору гематоэнцефалического барьера. Пониженная аффинность к рецептору привела к более широкому распространению в головном мозге (см., например, Atwal et al., Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yu et al., Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2011).

Примерами биспецифических антител также могут быть: (1) антитело с двойным переменным доменом (DVD-Ig), где каждая легкая и тяжелая цепь содержит два переменных домена в тандеме через короткую пептидную связь (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig<sup>TM</sup>) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) тандемное антитело, которое представляет собой слияние двух одноцепочечных антител, в результате чего получается

четырёхвалентное биспецифическое антитело, имеющее два сайта связывания для каждого из целевых антигенов; (3) флекситело, которое представляет собой комбинацию scFvs с диателом, в результате чего получается поливалентная молекула; (4) так называемая молекула "dock and lock", основанная на "доме-не димеризации и стыковки" в белковой киназе А, которая при применении к Fab может дать трехвалентный биспецифический связывающий белок, состоящий из двух идентичных Fab-фрагментов, соединенных с другим Fab-фрагментом; или (5) так называемая молекула Скорпиона, включающая, например, два scFv, слитых с обоими концами человеческой Fc-области. Примеры платформ, применимых для получения биспецифических антител, включают BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab и Mab2 (F-star), Fc-сконструированный IgG1 (Xencor) или DuoBody (на основе обмена Fab-плечами, Genmab).

Термин "эпитоп" относится к сайту антигена, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, наложенных друг на друга путем укладки третичной структуры одного или более белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот (также известные как линейные эпитопы), обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные в результате третичной укладки (также известные как конформационные эпитопы), обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3 и более, обычно, по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Антитела, которые распознают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы, можно идентифицировать с помощью простого иммуноанализа, показывающего способность одного антитела конкурировать со связыванием другого антитела с антигеном-мишенью. Эпитоп антитела также может быть определен рентгеновской кристаллографией антитела, связанного с его антигеном, для идентификации контактных остатков. 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.

Конкуренцию между антителами определяют с помощью анализа, в котором тестируемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (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%, как измерено в анализе конкурентного связывания. Некоторые тестируемые антитела ингибируют связывание эталонных антител по меньшей мере на 75%, 90% или 99%. Антитела, идентифицируемые в конкурентном анализе (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным достаточно близко к эпитопу, связываемому эталонным антителом, для появления стерического затруднения.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель, разбавитель, эксципиент или вспомогательное вещество совместимы с другими ингредиентами лекарственного состава и по существу не являются вредными для их реципиента.

Термин "пациент", включает людей и других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

Индивидуум подвержен повышенному риску заболевания, если у него имеется по крайней мере один известный фактор риска (например, генетический, биохимический, семейная история и ситуационное воздействие), в результате чего индивидуумы с этим фактором риска подвергаются статистически значимо большему риску развития заболевания, чем индивидуумы без этого фактора риска.

Термин "биологический образец" относится к образцу биологического материала, находящемуся внутри или полученному из биологического источника, например, человека или млекопитающего. Такие образцы могут быть органами, органеллами, тканями, частями тканей, жидкостями организма, периферической кровью, плазмой крови, сывороткой крови, клетками, молекулами, такими как белки и пептиды, и любыми частями или комбинациями, полученными из них. Термин "биологический образец" также может охватывать любой материал, полученный в результате обработки образца.

Производный материал может включать клетки или их потомство. Обработка биологического образца может включать одно или более из фильтрации, дистилляции, экстракции, концентрирования, фиксации, инактивации интерферирующих компонентов и т.п.

Термин "контрольный образец" относится к биологическому образцу, о котором не известно или не предполагается, что он включает пораженные участки тау-ассоциированным заболеванием, или по меньшей мере не известно или не предполагается, что он включает пораженные участки определенного типа. Контрольные образцы могут быть получены от людей, не страдающих тау-ассоциированным заболеванием. В качестве альтернативы контрольные образцы можно получить от пациентов, страдающих

тау-ассоциированным заболеванием. Такие образцы могут быть получены одновременно с биологическим образцом, предположительно содержащим тау-ассоциированное заболевание, или в другом случае. Биологический образец и контрольный образец могут быть получены из одной и той же ткани. Предпочтительно контрольные образцы состоят в основном или полностью из нормальных, здоровых областей и могут использоваться по сравнению с биологическим образцом, который, как считается, включает участки, пораженные тау-ассоциированным заболеванием. Предпочтительно ткань в контрольном образце относится к тому же типу, что и ткань в биологическом образце. Предпочтительно клетки, пораженные тау-ассоциированным заболеванием, которые, как предполагается, присутствуют в биологическом образце, происходят из того же типа клеток (например, нейронов или глии), что и тип клеток в контрольном образце.

Термин "заболевание" относится к любому аномальному состоянию, которое нарушает физиологическую функцию. Этот термин широко используется для обозначения любого расстройства, заболевания, аномалии, патологии, недомогания, состояния или синдрома, при которых нарушена физиологическая функция, независимо от природы этиологии.

Термин "симптом" относится к субъективным признакам заболевания, таким как измененная походка согласно ощущениям субъекта. "Признак" относится к объективным свидетельствам заболевания, наблюдаемым врачом.

Термин "положительный ответ на лечение" относится к более благоприятному ответу у отдельного пациента или к среднему ответу в популяции пациентов по сравнению со средним ответом в контрольной популяции, не получающей лечение.

В целях классификации аминокислотных замен как консервативных или неконсервативных, аминокислоты сгруппированы следующим образом: группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; группа III (кислотные боковые цепи): asp, glu; группа IV (основные боковые цепи): asn, gln, his, lys, arg; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): gly, pro; и группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe. Консервативные замены включают замены между аминокислотами одного и того же класса. Неконсервативные замены представляют собой замену члена одного из этих классов членом другого класса.

Процент идентичности последовательностей определяют с использованием последовательностей антител, максимально выровненных согласно системе нумерации по Kabat. После выравнивания, если субъектная область антитела (например, вся зрелая вариабельная область тяжелой или легкой цепи) сравнивается с той же областью эталонного антитела, процент идентичности последовательностей между исследуемой и эталонной областями антитела представляет собой количество положений, занимаемых одной и той же аминокислотой как в исследуемой, так и в эталонной области антитела, разделенное на общее количество выровненных положений двух областей без учета пробелов, умноженное на 100 для преобразования в процент.

Композиции или способы, "содержащие" или "включающие" один или более перечисленных элементов, могут включать в себя другие элементы, не указанные конкретно. Например, композиция, которая "содержит" или "включает" антитело, может содержать антитело отдельно или в комбинации с другими ингредиентами.

Обозначение диапазона значений включает в себя все целые числа в пределах диапазона или определяющие диапазон, и все поддиапазоны, определяемые целыми числами в пределах диапазона.

Если иное не очевидно из контекста, термин "около" охватывает несущественные вариации, такие как значения в пределах стандартной погрешности измерения (например, СОС) установленного значения.

Статистическая значимость означает  $p \leq 0,05$ .

Формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Например, термин "соединение" или "по меньшей мере одно соединение" может включать множество соединений, включая их смеси.

### **Подробное описание сущности изобретения**

#### **I. Общие сведения**

В изобретении предложены антитела, которые связываются с тау. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56). Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность QIVYKP (SEQ ID NO: 57, что соответствует остаткам 307-312 тау-изоформы SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность EIVYKSP (SEQ ID NO: 58, что соответствует остаткам 391-397 тау-изоформы SEQ ID NO: 1). Эти антитела отличаются от 3D6 и других антител, характеризующихся связыванием с областью связывания микротрубочек (MTBR) человеческого тау, наличием дополнительного эпитопа рядом с С-концом тау. Дополнительная С-концевая специфичность эпитопа обеспечивает основу для связывания антителом повышенного числа конформационных форм тау, ассоциированных с патологией. Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность EIVYKS (SEQ ID NO: 277, что соответствует остаткам 391-396 тау-изоформы SEQ ID NO: 1). Примерами антител по изобретению являются 9F5,

10C12, 2D11, 12C4, 17C12 и 14H3. Некоторые антитела по изобретению служат для ингибирования или отсрочки развития патологий, ассоциированных с тау, и ассоциированного с ними ухудшения симптоматики. Хотя понимание механизма не требуется для осуществления изобретения, снижение токсичности может происходить в результате того, что антитело индуцирует фагоцитоз тау, ингибирует меж- или внутримолекулярную агрегацию тау или связывание с другими молекулами, стабилизацией нетоксичной конформации, ингибированием межклеточной или внутриклеточной передачи патогенных форм тау, блокадой фосфорилирования тау, предотвращением связывания тау с клетками или индуцированием протеолитического расщепления тау, среди прочих механизмов. Некоторые антитела по изобретению применимы для увеличения агрегации тау за счет увеличения молекулярной массы определенных агрегированных видов тау для снижения токсичности/поглощения клетками и/или увеличения клиренса. Большие агрегаты молекул тау могут проявлять пониженное поглощение нейронными клетками. Некоторые антитела по изобретению за счет двухвалентного связывания с тау сближают отдельные молекулы тау, способствуя агрегации в агрегат тау, слишком большой для поглощения нейронными клетками. Кроме того, для Fc-опосредованного фагоцитоза необходимо, чтобы несколько тау-связывающих антител находились в непосредственной близости.

Большой агрегат молекул тау может иметь множество связанных с ним антител к тау и обеспечивать кластер, необходимый для Fc-опосредованного фагоцитоза макрофагами. Антитела по изобретению или средства, которые индуцируют такие антитела, можно использовать в способах лечения или проведения профилактики болезни Альцгеймера и других заболеваний, связанных с тау.

## II. Целевые молекулы

Если иное не очевидно из контекста, ссылка на тау означает природную человеческую форму тау, включая все изоформы, независимо от того, присутствует ли посттрансляционная модификация (например, фосфорилирование, гликирование или ацетилирование). Существует шесть основных изоформ (вариантов сплайсинга) тау, встречающихся в головном мозге человека. Самый длинный из этих вариантов содержит 441 аминокислоту, от которых отщеплен исходный остаток met. Остатки пронумерованы в соответствии с изоформой 441. Таким образом, например, ссылка на фосфорилирование в положении 404 означает положение 404 изоформы 441 или соответствующее положение любой другой изоформы при максимальном выравнивании с изоформой 441. Аминокислотные последовательности изоформ и номера доступа в Swiss-Prot указаны ниже.

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

```

10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
70      80      90      100     110     120
SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
130     140     150     160     170     180
HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
190     200     210     220     230     240
TPSSGPEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR S RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
250     260     270     280     290     300
SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
310     320     330     340     350     360
PGGGSVQIVY KVDLSKVTS KCGSLGNIHN KPGGGQVEVK SEKLDKDRV QSKIGSLDNI
370     380     390     400     410     420
THVPGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
430     440

```

DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

10            20            30            40            50            60  
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG  
70            80            90            100            110            120  
 SETSDAKSTP TAEAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAAGADGKT  
130            140            150            160            170            180  
 KIATPRGAAP PGQKQANAT RIPAQTTPAP KTPSSGEP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR  
190            200            210            220            230            240  
 SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKS IGSTENLKHQ  
250            260            270            280            290            300  
 PGGGKVQIIN KKLDSLNVQS KCGSKDNIK VPGGGSVQIV YKPVDSLKVT SKCGSLGNIH  
310            320            330            340            350            360  
 HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG  
370            380            390            400            410  
 AEIVYKSPVV SGGTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

P10636-6 (человеческий тау 4R0N) (SEQ ID NO:3)

10            20            30            40            50            60  
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAEAGI GDTPSLEDEA  
70            80            90            100            110            120  
 AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKQANA TRIPAQTTPA  
130            140            150            160            170            180  
 PKTPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS  
190            200            210            220            230            240  
 AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGVQII NKKLDSLNVQ SKCGSKDNIK  
250            260            270            280            290            300  
 HVPGGGSVQI VYKPVDSLKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLDKDR RVQSKIGSLD  
310            320            330            340            350            360  
 NITHVPGGGN KKIETHKLTFR ENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSPRHL SNVSTGSID  
370            380  
 MVDSPQLATL ADEVSASLAK QGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

10            20            30            40            50            60  
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG  
70            80            90            100            110            120

SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG  
 130            140            150            160            170            180  
 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGGQANATR IPAKTPPAPK  
 190            200            210            220            230            240  
 TPPSSGEPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR RTPSLPTPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK  
 250            260            270            280            290            300  
 SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVT SKGSLGNIHKK  
 310            320            330            340            350            360  
 PGGGQVEVKS EKLDKDFKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFRN AKAKTDHGAE  
 370            380            390            400            410  
 IVYKSPVSG DTSRHLNSV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

## P10636-4 (SEQ ID NO:5)

10            20            30            40            50            60  
 MAEPRQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGD TD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG  
 70            80            90            100            110            120  
 SETSDAKSTP TAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KAKGADGKTK  
 130            140            150            160            170            180  
 KIATPRGAAP PGQKGGQANAT RPAKTPPAP KTPSSGEPK KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR  
 190            200            210            220            230            240  
 SRTPSLPTPT TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ  
 250            260            270            280            290            300  
 PGGGKVQIVY KPVLDKVT SKGSLGNIH KPGGGQVEVK SEKLDKDFKDRV QSKIGSLDNI  
 310            320            330            340            350            360  
 THVPGGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLNSV SSTGSIDMV  
 370            380  
 DSPQLATLAD EVSASLAKQGL

## P10636-2 (SEQ ID NO:6)

10            20            30            40            50            60  
 MAEPRQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGD TD AGLKAEAGI GDTPSLEDEA  
 70            80            90            100            110            120  
 AGHVTQARMV SKSKDGTGS DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGGQANA TRIPAKTPPA  
 130            140            150            160            170            180  
 PKTPSSGEPK KSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPT PTREPKKVAV VRTPPKSPSS  
 190            200            210            220            230            240  
 AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVLDKVT SKGSLGNIH  
 250            260            270            280            290            300  
 HKPGGGQVEV KSEKLDKDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG  
 310            320            330            340            350  
 AEIVYKSPVV SGDTSPRHLNSV SSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQGL

Ссылка на тау включает известные природные вариации, около 30 из которых перечислены в базе данных Swiss-Prot и их перестановки, а также мутации, ассоциированные с патологиями тау, такими как деменция, болезнь Пика, надъядерный паралич и т.д. (см., например, база данных Swiss-Prot и Poorkaj, et al. Ann Neurol. 43:815-825 (1998)). Некоторыми примерами мутаций тау, пронумерованных изоформой

441, являются мутация лизина в треонин в аминокислотном остатке 257 (K257T), мутация изолейцина в валин в положении аминокислоты 260 (I260V); мутация глицина в валин в положении аминокислоты 272 (G272V); мутация аспарагина в лизин в положении аминокислоты 279 (N279K); мутация аспарагина в гистидин в положении аминокислоты 296 (N296H); мутация пролина в серин в положении аминокислоты 301 (P301S); мутация пролина в лейцин в положении аминокислоты 301 (P301L); мутация глицина в валин в положении аминокислоты 303 (G303V); мутация серина в аспарагин в положении 305 (S305N); мутация глицина в серин в положении аминокислоты 335 (G335S); мутация валина в метионин в положении 337 (V337M); мутация глутаминовой кислоты в валин в положении 342 (E342V); мутация лизина в изолейцин в положении аминокислоты 369 (K369I); мутация глицина в аргинин в положении аминокислоты 389 (G389R); и мутация аргинина в триптофан в положении аминокислоты 406 аминокислоты (R406W).

Тау может быть фосфорилирован по одному или более аминокислотным остаткам, включая тирозин в положениях аминокислот 18, 29, 97, 310 и 394, серин в положениях аминокислот 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 положениях аминокислот 175, 181, 205, 212, 217, 231 и 403.

Если иное не очевидно из контекста, ссылка на тау или их фрагменты включает природные человеческие аминокислотные последовательности, включая их изоформы, мутанты и аллельные варианты.

### III. Антитела

#### A. Специфичность связывания и функциональные свойства

В изобретении предложены антитела, которые специфически связываются с тау. Некоторые антитела специфически связываются с тау на эпитопе, образованном аминокислотами одной или обеих из двух областей тау, имеющих общий основной мотив IVYK (SEQ ID NO: 276). Эти области определяются остатками 307-312 и 391-397 или 391-396 SEQ ID NO: 1, соответственно. Таким образом, антитело с одним сайтом связывания для тау, такое как scFv, может специфически связываться с тау на эпитопе, образованном из аминокислот в пределах любой из данных областей по отдельности, или с гибридным эпитопом, образованным аминокислотами из обеих этих областей. Антитело с двумя сайтами связывания для тау может также связывать эпитопы в пределах 307-312 и 391-397 или в пределах 391-396 одновременно из двух своих сайтов связывания. Эпитоп может находиться на одной или разных молекулах тау. Некоторые антитела по изобретению специфически связываются с пептидом, состоящим из остатков 307-312 тау, а именно остатков QIVYKP (SEQ ID NO: 57). Некоторые антитела по изобретению специфически связываются с пептидом, состоящим из остатков 391-397 тау, а именно EIVYKSP (SEQ ID NO: 58). Некоторые антитела по изобретению специфически связываются с пептидом, состоящим из остатков 391-396 тау, а именно EIVYKS (SEQ ID NO: 277). Некоторые антитела по изобретению специфически связываются с пептидом, состоящим из консенсусного мотива (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56). Эти антитела можно получить путем иммунизации тау-полипептидом, очищенным из природного источника или рекомбинантно экспрессированным. Антитела могут быть проверены на предмет связывания тау в нефосфорилированной форме, а также в форме, в которой один или более остатков, чувствительных к фосфорилированию, являются фосфорилированными. В изобретении также предоставлены антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и любое из вышеуказанных антител, например, эпитопом 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3. Также включены антитела, конкурирующие за связывание с тау с любым из вышеуказанных антител, такими как, например, конкурирующие с 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3. В одном варианте осуществления антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, такое как 9F5, или конкурирующие с эталонным антителом, обладают одним или более функциональными свойствами, такими как способность ингибировать интернализацию тау в нейрональных клетках. Необязательно, таким свойством обладают в той же степени в пределах экспериментальной ошибки или большей, чем эталонное антитело.

В изобретении предложено антитело, конкурирующее с 9F5 за связывание с тау и снижающее тау-индуцированную токсичность в нейронах. В изобретении предложено антитело, которое конкурирует с 9F5 за связывание с тау и обладает повышенной устойчивостью к стрессу при перемешивании. Примерами гуманизированных антител 9F5, которые конкурируют с 9F5 за связывание с тау и обладают повышенной устойчивостью к стрессу при перемешивании, являются L27cS/L37Q/M51G/L54R (DIM2), также известное как hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM2 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 133, L27cG/L37G/M51G/L54T (DIM14), также известное как hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM14 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 145 и L27cG/L37G/M51G/L54R (DIM13), также известное как hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM13 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 144. В изобретении предложено антитело, которое конкурирует с 9F5 за связывание с тау и обладает повышенной устойчивостью к стрессу при низком pH. Примерами гуманизированных антител 9F5, которые конкурируют с 9F5 за связывание с тау и обладают повышенной устойчивостью к стрессу при низком pH, являются L27cS/L37Q/M51G/L54R (DIM2), также известное как hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM2 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 133, L27cD/L37Q/M51G/L54R (DIM6), также известное как hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM6 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 137 и L27cG/L37G/M51G/L54R (DIM13), также известное как hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM13 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 144. Примерами гуманизированных антител 9F5, которые конкурируют с 9F5 за связывание

с тау и обладают повышенной устойчивостью к стрессу при перемешивании и повышенной устойчивостью к стрессу при низком pH, являются DIM 2 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM2 SEQ ID NO: 127/SEQ ID NO: 133], DIM6 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM6 SEQ ID NO: 127/SEQ ID NO: 137], DIM7 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM7 SEQ ID NO: 127/SEQ ID NO: 138], DIM8 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM8 SEQ ID NO: 127/SEQ ID NO: 139], DIM13 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM13 SEQ ID NO: 127/SEQ ID NO: 144], DIM18 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM18 SEQ ID NO: 127/SEQ ID NO: 149], DIM28 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM28 SEQ ID NO: 127/SEQ ID NO: 159] и DIM30 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM30 SEQ ID NO: 127/SEQ ID NO: 161].

В изобретении предложено антитело, конкурирующее с 9F5 за связывание с тау и имеющее пониженную склонность к агрегации в условиях высокой концентрации. Примером антитела, которое конкурирует с 9F5 за связывание с тау и имеет пониженную склонность к агрегации в условиях высокой концентрации, является L37Q/M51G/L54R в комбинации с исходным лейцином в положении L27с (DIM27), также известное как hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM27 SEQ ID NO: 127/SEQ ID NO: 158.

Вышеупомянутые антитела могут быть получены de novo путем иммунизации тау-пептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности QIVYKP (SEQ ID NO: 57), содержащим аминокислотную последовательность EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), содержащим аминокислотную последовательность EIVYKS (SEQ ID NO: 277), или содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56), или путем иммунизации полноразмерным тау-полипептидом или его фрагментом, содержащим такие остатки и скрининга на предмет специфического связывания с пептидом, включающим такие остатки. Такие тау-пептиды предпочтительно присоединены к молекуле гетерологичного конъюгата, которая помогает вызвать ответ антитела на пептид. Присоединение может быть прямым или через спейсерный пептид или аминокислоту. Цистеин используется в качестве спейсерной аминокислоты, поскольку его свободная группа SH облегчает прикрепление молекулы-носителя. Также можно использовать полиглициновый линкер (например, 2-6 глицинов) с остатком цистеина между глицинами и пептидом или без него. Молекула-носитель служит для обеспечения Т-клеточного эпитопа, который помогает вызвать ответ антитела на пептид. Обычно используются несколько носителей, в частности гемоцианин лимфы улитки (KLH), яичный альбумин и бычий сывороточный альбумин (BSA). Пептидные спейсеры могут быть добавлены к пептидному иммуногену в качестве части твердофазного пептидного синтеза. Носители обычно добавляются путем химического сшивания. Некоторые примеры химических сшивающих агентов, которые можно использовать, включают перекрестный N-малеимида-6-аминокапроиловый эфир или м-малеимидабензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (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)). Носитель и спейсер, если они присутствуют, могут быть присоединены к любому концу иммуногена.

Пептид с необязательным спейсером и носителем можно использовать для иммунизации лабораторных животных или В-клеток, как более подробно описано ниже. Супернатанты гибридом можно тестировать на способность связывать тау-пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности QIVYKP (SEQ ID NO: 57), пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности EIVYKS (SEQ ID NO: 277), или пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56) и/или фосфорилированные и не фосфорилированные формы тау, такие как, например, полноразмерная изоформа тау с положением 404 в фосфорилированной форме. Пептид может быть присоединен к носителю или другой метке для облегчения скринингового анализа. В этом случае носитель или метка предпочтительно отличается от комбинации спейсера и молекулы-носителя, используемой для иммунизации для устранения антител, специфичных для спейсера или носителя, а не тау-пептида. Может быть использована любая из изоформ тау.

Антитело, обозначенное 9F5, представляет собой пример антитела, специфически связывающегося с тау. Если иное не очевидно из контекста, ссылку на 9F5 следует понимать как относящуюся к любой из мышинных, химерных, венированных или гуманизированных форм этого антитела. Антитело было депонировано как [НОМЕР ДЕПОЗИТА]. Данное антитело специфически связывает пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности QIVYKP (SEQ ID NO: 57), пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), или пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56). CDR согласно композитному определению по Kabat/Chothia тяжелой цепи 9F5 обозначены SEQ4 ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, а CDR по Kabat легкой цепи 9F5 обозначены SEQ ID NO: 12, 13 и 1 соответственно.

Дополнительные антитела, которые конкурируют с 9F5 за связывание с тау и/или связывают тот же или перекрывающийся эпитоп, что и 9F5, были выделены, обозначены 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 и 14H3, и продуцированы гибридомами с такими же названиями. 10C12 имеет зрелые вариабельные области тяжелых и легких цепей (после отщепления сигнального пептида), охарактеризованные SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11, соответственно. Если иное не очевидно из контекста, ссылку на 10C12 следует понимать

как относящуюся к любой из мышинных, химерных, венированных и гуманизированных форм этого антитела. 10C12 депонирован как [НОМЕР ДЕПОЗИТА]. 10C12 дополнительно характеризуется своей способностью связывать как непатологические, так и патологические формы и конформации тау, а также неправильно свернутые/агрегированные формы тау. 10C12 связывает структурные признаки, такие как клубки тау и дистрофические нейриты в ткани, вызванные болезнью Альцгеймера, и осаждает как мономерный, так и агрегированный тау из экстрактов болезни Альцгеймера.

2D11 имеет зрелые вариабельные области тяжелых и легких цепей (после отщепления сигнального пептида), охарактеризованные SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11 соответственно. Если иное не очевидно из контекста, ссылку на 2D11 следует понимать как относящуюся к любой из мышинных, химерных, венированных и гуманизированных форм этого антитела. 2D11 депонирован как [НОМЕР ДЕПОЗИТА]. 2D11 дополнительно характеризуется своей способностью связывать как непатологические, так и патологические формы и конформации тау, а также неправильно свернутые/агрегированные формы тау. 2D11 связывает структурные признаки, такие как клубки тау и дистрофические нейриты в ткани, вызванные болезнью Альцгеймера, и осаждает как мономерный, так и агрегированный тау из экстрактов болезни Альцгеймера.

12C4 имеет зрелые вариабельные области тяжелых и легких цепей (после отщепления сигнального пептида), охарактеризованные SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 11, соответственно. Если иное не очевидно из контекста, ссылку на 12C4 следует понимать как относящуюся к любой из мышинных, химерных, венированных и гуманизированных форм этого антитела. 12C4 депонирован как [НОМЕР ДЕПОЗИТА]. 12C4 дополнительно характеризуется своей способностью связывать как непатологические, так и патологические формы и конформации тау, а также неправильно свернутые/агрегированные формы тау. 12C4 связывает структурные признаки, такие как клубки тау и дистрофические нейриты в ткани, вызванные болезнью Альцгеймера, и осаждает как мономерный, так и агрегированный тау из экстрактов болезни Альцгеймера.

17C12 имеет зрелые вариабельные области тяжелых и легких цепей (после отщепления сигнального пептида), охарактеризованные SEQ ID NO: 225 и SEQ ID NO: 228, соответственно. Если иное не очевидно из контекста, ссылку на 17C12 следует понимать как относящуюся к любой из мышинных, химерных, венированных и гуманизированных форм этого антитела. 17C12 депонирован как [НОМЕР ДЕПОЗИТА]. 17C12 дополнительно характеризуется своей способностью связывать как непатологические, так и патологические формы и конформации тау, а также неправильно свернутые/агрегированные формы тау.

14H3 имеет зрелые вариабельные области тяжелых и легких цепей (после отщепления сигнального пептида), охарактеризованные SEQ ID NO: 240 и SEQ ID NO: 244, соответственно. Если иное не очевидно из контекста, ссылку на 14H3 следует понимать как относящуюся к любой из мышинных, химерных, венированных и гуманизированных форм этого антитела. 14H3 депонирован как [НОМЕР ДЕПОЗИТА]. 14H3 дополнительно характеризуется своей способностью связывать как непатологические, так и патологические формы и конформации тау, а также неправильно свернутые/агрегированные формы тау. 14H3 связывает структурные признаки, такие как клубки тау и дистрофические нейриты в ткани, вызванные болезнью Альцгеймера.

Выравнивания зрелых вариабельных областей тяжелой цепи мышинных антител 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 14H3 и 17C12 изображены на фиг. 24, а выравнивания зрелых вариабельных областей легкой цепи мышинных антител 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 14H3 и 17C12 изображены на фиг. 25. Аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи мышинного антитела 10C12 имеет 100% идентичность последовательности с последовательностью мышинного антитела 9F5, а зрелая вариабельная область легкой цепи мышинного антитела 10C12 имеет 100% идентичность последовательности с последовательностью мышинного антитела 9F5. Аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи мышинного антитела 2D11 имеет 100% идентичность последовательности с последовательностью мышинного антитела 9F5, а зрелая вариабельная область легкой цепи мышинного антитела 2D11 имеет 100% идентичность последовательности с последовательностью мышинного антитела 9F5. Аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи мышинного антитела 12C4 имеет 96,6% идентичность последовательности с последовательностью мышинного антитела 9F5, а зрелая вариабельная область легкой цепи мышинного антитела 12C4 имеет 100% идентичность последовательности с последовательностью мышинного антитела 9F5. Аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи мышинного антитела 17C12 имеет 95,9% идентичность последовательности с последовательностью мышинного антитела 9F5, а зрелая вариабельная область легкой цепи мышинного антитела 17C12 имеет 70,5% идентичность последовательности с последовательностью мышинного антитела 9F5. Аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи мышинного антитела 14H3 имеет 35,0% идентичность последовательности с последовательностью мышинного антитела 9F5, а зрелая вариабельная область легкой цепи мышинного антитела 14H3 имеет 73,2% идентичность последовательности с последовательностью мышинного антитела 9F5.

Необязательно антитела по изобретению не включают антитело 10C12. Необязательно антитела по изобретению не включают антитело 2D11. Необязательно антитела по изобретению не включают антитело 12C4. Необязательно антитела по изобретению не включают антитело 17C12. Необязательно антитела

по изобретению не включают антитело 14НЗ.

Некоторые антитела по изобретению связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и антитело, обозначенное 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14НЗ. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей этого 9F5 обозначены SEQ ID NO: 7 и 11 соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 10C12 обозначены SEQ ID NO: 7 и 11, соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 2D11 обозначены SEQ ID NO: 7 и 11 соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 12C4 обозначены SEQ ID NO: 219 и 11, соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 17C12 обозначены SEQ ID NO: 225 и 228, соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 14НЗ обозначены SEQ ID NO: 240 и 244 соответственно. Другие антитела, обладающие такой специфичностью связывания, можно получить путем иммунизации мышей с помощью тау или его части, включая желаемый эпитоп (например, тау-пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности QIVYKP (SEQ ID NO: 57), тау-пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), тау-пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности EIVYKS (SEQ ID NO: 277), или тау-пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56)) и скрининга полученных антител на предмет связывания с тау, необязательно в конкуренции с антителом, имеющим переменные области мышинных 9F5 (IgG1/каппа), 10C12 (IgG2a/каппа), 2D11 (IgG2a/каппа), 12C4 (IgG2a/каппа), 17C12 (IgG2a/каппа) или 14НЗ (IgG2a/каппа). Фрагменты тау, включая желаемый эпитоп, могут быть связаны с носителем, который помогает вызвать ответ антител на фрагмент, и/или объединяться с адъювантом, что помогает вызвать такой ответ. Такие антитела можно подвергать скринингу на предмет дифференциального связывания с тау или его фрагментом по сравнению с мутантами по указанным остаткам. Скрининг на предмет таких мутантов более точно определяет специфичность связывания, позволяющую идентифицировать антитела, связывание которых ингибируется мутагенезом определенных остатков и которые, вероятно, обладают функциональными свойствами других приведенных в качестве примеров антител. Мутации могут представлять собой систематическую замену аланином (или серином, если аланин уже присутствует) по одному остатку за раз или с более широкими интервалами по всей мишени или по всему ее участку, в котором, как известно, находится эпитоп. Если один и тот же набор мутаций значительно снижает связывание двух антител, два антитела связывают один и тот же эпитоп.

Антитела, обладающие специфичностью связывания с выбранным мышинным антителом (например, 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14НЗ), также могут быть получены с использованием варианта метода фагового дисплея. См. Winter, WO 92/20791. Этот метод особенно подходит для получения человеческих антител. В этом методе в качестве исходного материала используется переменная область тяжелой или легкой цепи выбранного мышинного антитела. Если, например, в качестве исходного материала выбрана переменная область легкой цепи, создается фаговая библиотека, члены которой отображают одну и ту же переменную область легкой цепи (т.е. исходный мышинный материал) и другую переменную область тяжелой цепи. Переменные области тяжелой цепи можно, например, получить из библиотеки реаранжированных переменных областей тяжелой цепи человека. Выбирают фаг, демонстрирующий сильное специфическое связывание с тау или его фрагментом (например, по меньшей мере 10 и предпочтительно по меньшей мере  $10^9$  M<sup>-1</sup>). Затем переменная область тяжелой цепи этого фага служит исходным материалом для создания дополнительной фаговой библиотеки. В этой библиотеке каждый фаг отображает одну и ту же переменную область тяжелой цепи (т.е. область, идентифицированную из первой отображаемой библиотеки) и другую переменную область легкой цепи. Переменные области легкой цепи можно получить, например, из библиотеки реаранжированных переменных областей легкой цепи человека. Опять же, выбирают фаг, демонстрирующий сильное специфическое связывание с тау или его фрагментом. Полученные антитела как правило обладают такой же или сходной эпитопной специфичностью, что и мышинный исходный материал.

CDR согласно композитному определению по Kabat/Chothia тяжелой цепи 9F5 обозначены SEQ ID NO: 8-10 соответственно, а CDR по Kabat легкой цепи 9F5 обозначены SEQ ID NO: 12-14 соответственно.

CDR согласно композитному определению по Kabat/Chothia тяжелой цепи 10C12 обозначены SEQ ID NO: 8-10 соответственно, а CDR по Kabat легкой цепи 10C12 обозначены SEQ ID NO: 12-14 соответственно.

CDR согласно композитному определению по Kabat/Chothia тяжелой цепи 2D11 обозначены SEQ ID NO: 8-10 соответственно, а CDR по Kabat легкой цепи 2D11 обозначены SEQ ID NO: 12-14 соответственно.

Табл. 2 указывает на CDR 9F5, 10C12 и 2D11 согласно определениям по Kabat, Chothia, композитному определению по Chothia и Kabat (также именуемому здесь как "композитное определение по Kabat/Chothia"), определениям по AbM и Contact.

Таблица 2. CDR 9F5, 10C12 и 2D11, согласно определениям по Kabat, Chothia, композитному определению по Chothia и Kabat, определениям по AbM и Contact

Петля	Kabat	Chothia	Композитное определение по Chothia и Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L30--L36 SEQ ID NO:47
L2	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L46--L55 SEQ ID NO:48
L3	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L96 SEQ ID NO:49
H1	H31--H35B SEQ ID NO:40	H26--H32 SEQ ID NO:41	H26--H35B SEQ ID NO:8	H26--H35B SEQ ID NO:8	H30--H35B SEQ ID NO:44
H2	H50--H65 SEQ ID NO:9	H52--H56 SEQ ID NO:42	H50--H65 SEQ ID NO:9	H50--H58 SEQ ID NO:43	H47--H58 SEQ ID NO:45
H3	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H93--H101 SEQ ID NO:46

CDR согласно композитному определению по Kabat/Chothia тяжелой цепи 12C4 обозначены SEQ ID NO: 8, 220 и 10, соответственно, а CDR по Kabat легкой цепи 12C4 обозначены SEQ ID NO: 12-14 соответственно.

Табл. 3 указывает на CDR 12C4 согласно определениям по Kabat, Chothia, композитному определению по Chothia и Kabat (также именуемому здесь как "композитное определение по Kabat/Chothia"), определениям по AbM и Contact.

Таблица 3. CDR 12C4, согласно определениям по Kabat, Chothia, композитному определению по Chothia и Kabat, определениям по AbM и Contact

Петля	Kabat	Chothia	Композитное определение по Chothia и Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L30--L36 SEQ ID NO:47
L2	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L46--L55 SEQ ID NO:48
L3	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L96 SEQ ID NO:49
H1	H31--H35B SEQ ID NO:40	H26--H32 SEQ ID NO:41	H26--H35B SEQ ID NO:8	H26--H35B SEQ ID NO:8	H30--H35B SEQ ID NO:44
H2	H50--H65 SEQ ID NO:220	H52--H56 SEQ ID NO:42	H50--H65 SEQ ID NO:220	H50--H58 SEQ ID NO:257	H47--H58 SEQ ID NO:258
H3	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H93--H101 SEQ ID NO:46

CDR согласно композитному определению по Kabat/Chothia тяжелой цепи 17C12 обозначены SEQ ID NO: 226, 227 и 10, соответственно, а CDR по Kabat легкой цепи 17C12 обозначены SEQ ID NO: 229-231, соответственно.

Табл. 4 указывает на CDR 17C12 согласно определениям по Kabat, Chothia, композитному определению по Chothia и Kabat (также именуемому здесь как "композитное определение по Kabat/Chothia"), определениям по AbM и Contact.

Таблица 4. CDR 17C12, согласно определениям по Kabat, Chothia, композитному определению по Chothia и Kabat, определениям по AbM и Contact

Петля	Kabat	Chothia	Композитное определение по Chothia и Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:229	L24--L34 SEQ ID NO:229	L24--L34 SEQ ID NO:229	L24--L34 SEQ ID NO:229	L30--L36 SEQ ID NO:262
L2	L50--L56 SEQ ID NO:230	L50--L56 SEQ ID NO:230	L50--L56 SEQ ID NO:230	L50--L56 SEQ ID NO:230	L46--L55 SEQ ID NO:263
L3	L89--L97 SEQ ID NO:231	L89--L97 SEQ ID NO:231	L89--L97 SEQ ID NO:231	L89--L97 SEQ ID NO:231	L89--L96 SEQ ID NO:264
H1	H31--H35B SEQ ID NO:40	H26--H32 SEQ ID NO:259	H26--H35B SEQ ID NO:226	H26--H35B SEQ ID NO:226	H30--H35B SEQ ID NO:44
H2	H50--H65 SEQ ID NO:227	H52--H56 SEQ ID NO:42	H50--H65 SEQ ID NO:227	H50--H58 SEQ ID NO:260	H47--H58 SEQ ID NO:261
H3	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H93--H101 SEQ ID NO:46

CDR согласно композитному определению по Kabat/Chothia тяжелой цепи 14H3 обозначены SEQ ID NO: 241-243, соответственно, а CDR по Kabat легкой цепи 14H3 обозначены SEQ ID NO: 245-247, соответственно.

Табл. 5 указывает на CDR 14H3 согласно определениям по Kabat, Chothia, композитному определению по Chothia и Kabat (также именуемому здесь как "композитное определение по Kabat/Chothia"), определениям по AbM и Contact.

Таблица 5. CDR 14H3, согласно определениям по Kabat, Chothia, композитному определению по Chothia и Kabat, определениям по AbM и Contact

Петля	Kabat	Chothia	Композитное определение по Chothia и Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:245	L24--L34 SEQ ID NO:245	L24--L34 SEQ ID NO:245	L24--L34 SEQ ID NO:245	L30--L36 SEQ ID NO:272
L2	L50--L56 SEQ ID NO:246	L50--L56 SEQ ID NO:246	L50--L56 SEQ ID NO:246	L50--L56 SEQ ID NO:246	L46--L55 SEQ ID NO:273
L3	L89--L97 SEQ ID NO:247	L89--L97 SEQ ID NO:247	L89--L97 SEQ ID NO:247	L89--L97 SEQ ID NO:247	L89--L96 SEQ ID NO:274
H1	H31--H35B SEQ ID NO:265	H26--H32 SEQ ID NO:266	H26--H35B SEQ ID NO:241	H26--H35B SEQ ID NO:241	H30--H35B SEQ ID NO:269
H2	H50--H65 SEQ ID NO:242	H52--H56 SEQ ID NO:267	H50--H65 SEQ ID NO:242	H50--H58 SEQ ID NO:268	H47--H58 SEQ ID NO:270
H3	H95--H102 SEQ ID NO:243	H95--H102 SEQ ID NO:243	H95--H102 SEQ ID NO:243	H95--H102 SEQ ID NO:243	H93--H101 SEQ ID NO:271

Другие антитела можно получить путем мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи приведенного в качестве примера антитела, такого как 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3. Моноклональные антитела, которые по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3 в аминокислотной последовательности зрелых вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепи и сохраняющие свои функциональные свойства, и/или которые отличаются от соответствующего антитела небольшим количеством функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок, также включены в изобретение. Также включены моноклональные антитела, имеющие по меньшей мере одну или все шесть CDR, как определено согласно любому традиционному определению, но предпочтительно по Kabat, которые на 90%, 95%, 99% или 100% идентичны соответствующим CDR 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3.

В изобретении также предложены антитела, имеющие некоторые или все (например, 3, 4, 5 и 6) CDR полностью или по существу из 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3. Такие антитела могут включать вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере две, а обычно все три, CDR полностью или в по существу из вариабельной области тяжелой цепи 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3 и/или вариабельную область легкой цепи, которая имеет по меньшей мере две, а обычно все три CDR полностью или по существу из вариабельной области легкой цепи 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3. Антитела могут включать в себя как тяжелые, так и легкие цепи. CDR по существу происходит из соответствующей CDR 9F5, если она содержит не более 4, 3, 2 или 1 замены, вставки или делеции, за исключением того, что CDR-H2 (в случае определения по Kabat) может иметь не более 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замены, вставки или делеции. Такие антитела могут иметь по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3 в аминокислотной последовательности зрелых вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепи и сохранять свои функциональные свойства, и/или отличаться от 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3 небольшим количеством функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативными заменами), делециями или вставками.

Некоторые антитела, идентифицированные с помощью таких анализов, могут связываться с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными, фосфорилированными или нефосфорилированными формами тау или другими формами. Аналогичным образом, некоторые антитела являются имму-

нореактивными в отношении непатологических и патологических форм и конформаций тау.

В изобретении дополнительно предложены средства для специфического связывания с пептидом, состоящим из остатков (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56), остатков QIVYKP (SEQ ID NO: 57), остатков EIVYKSP (SEQ ID NO: 58) или остатков EIVYKS (SEQ ID NO: 277). Примером средства является антитело, содержащее CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 8-10 и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 12-14. Примером средства является антитело, содержащее CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 8, 220 и 10 и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 12-14. Примером средства является антитело, содержащее CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 226, 227 и 10, и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 229-231. Примером средства является антитело, содержащее CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 241-243 и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 245-247.

#### В. Нечеловеческие антитела

Получение других нечеловеческих антител, например, антител мыши, морской свинки, примата, кролика или крысы к тау или его фрагменту (например, пептид, включающий аминокислотную последовательность QIVYKP (SEQ ID NO: 57), EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), EIVYKS (SEQ ID NO: 277) или (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56)) может быть осуществлено, например, путем иммунизации животного с помощью тау или его фрагмента. См. Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (включена в данный документ для всех целей). Необязательно, иммуноген может представлять собой человеческий тау из 383 аминокислот (4R0N). Необязательно, иммуноген может представлять собой человеческий тау, содержащий мутацию P301S. Необязательно, иммуноген может представлять собой человеческий тау, причем человеческий тау является рекомбинантным His-меченным на N-конце. Необязательно, животное иммунизируют фрагментом тау, содержащим пептид, представленный (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56), связанный с носителем. Необязательно, пептид представляет собой QIVYKP (SEQ ID NO: 57) или EIVYKSP (SEQ ID NO: 58) или EIVYKS (SEQ ID NO: 277). Такой иммуноген можно получить из природного источника, путем синтеза пептидов или путем рекомбинантной экспрессии. Необязательно, иммуноген может быть введен слитым или иным образом объединенным с белком-носителем. Необязательно, иммуноген может быть введен с адъювантом. Можно использовать несколько типов адъюванта, как описано ниже. Полный адъювант Фрейнда с последующим неполным адъювантом может быть использован для иммунизации лабораторных животных. Для получения поликлональных антител обычно используют кроликов или морских свинок. Мышей обычно используют для получения моноклональных антител. Антитела подвергаются скринингу на предмет специфического связывания с тау или эпитопом внутри тау (например, QIVYKP (SEQ ID NO: 57), EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), EIVYKS (SEQ ID NO: 277) или (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56)). Необязательно, скрининг можно проводить в отношении пептидов из 15 аминокислот, содержащих QIVYKP (SEQ ID NO: 57), EIVYKSP (SEQ ID NO: 58) EIVYKS (SEQ ID NO: 277) или любой другой консенсусный мотив, представленный (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56). Необязательно, пептиды содержат QIVYKP (SEQ ID NO: 57), EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), EIVYKS (SEQ ID NO: 277). Такой скрининг может быть осуществлен путем определения связывания антитела с набором вариантов тау, таких как варианты тау, содержащие или состоящие из аминокислотных остатков 307-312, 391-397 или 391-396 SEQ ID NO: 1) или мутаций в пределах этих остатков и определения того, какие варианты тау связываются с антителом. Связывание можно оценить, например, с помощью вестерн-блоттинга, FACS или твердофазного ИФА.

#### С. Гуманизированные антитела

Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDR от нечеловеческого "донорского" антитела привиты к человеческим последовательностям "акцепторного" антитела (см., например, Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US 6407213; US Adair, 5859205 и Foote, US 6881557). Последовательности акцепторного антитела могут представлять собой, например, последовательность зрелого человеческого антитела, композитом таких последовательностей, консенсусной последовательностью последовательностей человеческого антитела или последовательностью области зародышевой линии. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее по меньшей мере три, четыре, пять или все CDR полностью или в по существу из донорского антитела и последовательностей каркасов варибельной области и константных областей, если они присутствуют, полностью или по существу из последовательностей человеческого антитела. Аналогичным образом, гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или по существу из тяжелой цепи донорского антитела, а последовательность каркасов варибельной области тяжелой цепи и константная область тяжелой цепи, если они присутствуют, по существу из последовательности каркаса варибельной области тяжелой цепи и константной области человека. Аналогичным образом, гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или по существу из легкой цепи донорского антитела, а последовательность каркасов варибельной области легкой цепи и константная область легкой цепи, если они присутствуют, по существу из последовательности каркаса варибельной области легкой цепи и константной области человека. В отличие от нанотел и dAb, гуманизированное антитело содержит гуманизованную тяжелую цепь и гуманизованную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе по существу аналогична соответствующей CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено согласно любому традиционному опре-

делению, но предпочтительно определено по Kabat) идентичны между соответствующими CDR. Последовательности каркасов варибельной области цепи антитела или константной области цепи антитела по существу происходят из последовательности каркаса варибельной области человека или константной области человека, соответственно, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков согласно определению по Kabat являются идентичными. Для отнесения антитела к категории гуманизированных в соответствии с определением гуманизированных антител, предоставленным в 2014 году Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) по международным непатентованным наименованиям (МНН), антитело должно иметь не менее 85% идентичности с последовательностями антител зародышевой линии человека (т.е. до соматической гипермутации). Смешанные антитела представляют собой антитела, для которых одна цепь антитела (например, тяжелая цепь) соответствует пороговому значению, а другая цепь (например, легкая цепь) не соответствует пороговому значению. Антитело классифицируется как химерное, если ни одна из цепей не соответствует пороговому значению, даже если каркасные варибельные области для обеих цепей были по существу человеческими с некоторыми обратными мутациями у мышей. См., Jones et al. (2016) The INNs and outs of antibody nonproprietary names, mAbs 8:1, 1-9, DOI: 10.1080/19420862.2015.1114320. См. также "WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)" (Internet) 2014. Доступно по адресу: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>, включено в данный документ посредством ссылки. Во избежание сомнений, термин "гуманизированный", используемый в данном документе, не предназначен для ограничения определением гуманизированных антител по МНН ВОЗ от 2014 г. Некоторые из гуманизированных антител, предложенных в данном документе, имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека, а некоторые из гуманизированных антител, предложенных в данном документе, имеют менее 85% идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые из тяжелых цепей гуманизированных антител, предложенных в данном документе, имеют от около 60 до 100% идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека, например, в диапазоне от около 60 до 69%, от 70 до 79%, от 80 до 84% или от 85 до 89%. Некоторые тяжелые цепи не соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 г. и имеют, например, около 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81% или 82%, 83 или 84% идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека, в то время как другие тяжелые цепи соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 г. и имеют около 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или более идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые из легких цепей гуманизированных антител, предложенных в данном документе, имеют от около 60 до 100% идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека, например, в диапазоне от около 80 до 84% или от 85 до 89%. Некоторые легкие цепи не соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 г. и имеют, например, около 81%, 82%, 83% или 84% идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека, в то время как другие легкие цепи соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 г. и имеют около 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или более идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые предложенные в данном документе гуманизированные антитела, которые являются "химерными" в соответствии с определением МНН ВОЗ от 2014 г., имеют тяжелые цепи с менее чем 85% идентичности с последовательностями зародышевой линии человека, спаренные с легкими цепями, имеющими менее 85% идентичности с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в данном документе, являются "смешанными" в соответствии с определением МНН ВОЗ от 2014 г., например, имеющими тяжелую цепь с по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностями зародышевой линии человека, спаренную с легкой цепью, имеющей менее 85% идентичности последовательности с последовательностями зародышевой линии человека, или наоборот. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в данном документе, соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 г. в отношении термина "гуманизированный" и имеют тяжелую цепь с по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностями зародышевой линии человека, спаренную с легкой цепью, имеющей по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностями зародышевой линии человека. Примеры антител 12C4, которые соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 г. как "гуманизированные", включают антитела, имеющие зрелую тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 221 или SEQ ID NO: 222, спаренную с последовательностью зрелой легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223 или SEQ ID NO: 224. Примеры антител 14H3, которые соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 г. как "гуманизированные", включают антитела, имеющие зрелую тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 248 или SEQ ID NO: 249, спаренную с последовательностью зрелой легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 251 или SEQ ID NO: 252. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в данном документе, соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 г. как "смешанные". Примеры антител 9F5, которые соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 г. как "смешанные", включают антитела, имеющие зрелую тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15-22 и SEQ ID NO: 127-128, спаренную с

последовательностью зрелой легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26-29 или SEQ ID NO: 130-131. Примеры антител 10C12, которые соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 г. как "смешанные", включают антитела, имеющие зрелую тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 214 или SEQ ID NO: 215, спаренную с последовательностью зрелой легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216 или SEQ ID NO: 217. Примеры антител 17C12, которые соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 г. как "смешанные", включают антитела, имеющие зрелую тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 232 или SEQ ID NO: 233, спаренную с последовательностью зрелой легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235. Дополнительные гуманизированные антитела 9F5 по изобретению включают антитела, имеющие зрелую тяжелую цепь, имеющую любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 15-22 и SEQ ID NO: 127-128, спаренную со зрелой легкой цепью, имеющей любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23-25. Дополнительные гуманизированные антитела 17C12 по изобретению включают антитела, имеющие зрелую тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 232 или SEQ ID NO: 233, спаренную со зрелой легкой цепью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 234.

Хотя гуманизированные антитела часто включают все шесть CDR (определяемых согласно любому традиционному определению, но предпочтительно определяемых по Kabat) из мышинового антитела, они также могут быть изготовлены с применением менее чем всех CDR (например, по меньшей мере 3, 4 или 5 CDR) из мышинового антитела (например, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *J. of Mol. Biol.*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *J. Immunol.* 164:1432-1441, 2000).

В некоторых антителах только часть CDR, а именно подмножество остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR, необходимы для сохранения связывания в гуманизированном антителе. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и не входящие в SDR, могут быть идентифицированы на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDR H2 часто не требуются) из областей CDR по Kabat, расположенных вне гипервариабельных петель по Chothia (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987) путем молекулярного моделирования и/или эмпирически, или как описано у Gonzales et al., *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. В таких гуманизированных антителах в положениях, в которых один или более остатков донорских CDR отсутствуют или в которых опущены целые донорные CDR, аминокислота, занимающая это положение, может представлять собой аминокислоту, занимающую соответствующее положение (по нумерации Kabat) в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замен акцепторных на донорные аминокислоты в CDR, которое необходимо включить, отражает баланс между конкурирующими соображениями. Такие замены потенциально полезны для уменьшения количества аминокислот мыши в гуманизированном антителе и, следовательно, уменьшения потенциальной иммуногенности и/или соответствия определению МНН ВОЗ в отношении термина "гуманизированный". Однако замены также могут вызывать изменения аффинности, поэтому предпочтительно избегать значительного снижения аффинности. Положения для замены в CDR и заменяемые аминокислоты также могут быть выбраны эмпирически.

Последовательности акцепторных человеческих антител могут быть выбраны из множества известных последовательностей человеческих антител для обеспечения высокой степени идентичности последовательностей (например, 65-85% идентичности) между каркасами вариабельной области акцепторной последовательности человека и соответствующими каркасами вариабельной области донорской цепи антитела.

Некоторые гуманизированные и химерные антитела обладают одинаковыми (в пределах экспериментальной ошибки) или улучшенными функциональными свойствами, например, аффинностью связывания с человеческим тау, ингибированием интернализации тау в нейроны, как описано в примерах, как мышинные антитела, из которых они были получены. Например, некоторые гуманизированные и химерные антитела обладают аффинностью связывания с коэффициентом 3, 2 или 1 от мышинового антитела, из которого они были получены, или аффинностью, неразличимой в пределах экспериментальной ошибки. Некоторые гуманизированные и химерные антитела ингибируют интернализацию тау в нейроны, как описано в примерах, с коэффициентом 3, 2 или 1 от мышинового антитела, из которого они были получены, или ингибируют то же самое в пределах экспериментальной ошибки, что и мышинное антитело, из которого они были получены.

Примером акцепторной последовательности тяжелой цепи 9F5 является зрелая вариабельная область тяжелой цепи человека гуманизированного Fab 48G7 с кодом доступа PDB 2RCS-VH\_huFrwk (SEQ ID NO: 32). Примером акцепторной последовательности тяжелой цепи 9F5 является зрелая тяжелая цепь человека, GenBank AAN16432-VH\_huFrwk (SEQ ID NO: 31). Вариабельные домены Fab 9F5 и 48G7 также имеют одинаковую длину в отношении петель CDR-H1, H2. Примером акцепторной последовательности тяжелой цепи 9F5 является зрелая вариабельная область тяжелой цепи человека, IMGT № IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33). CDR-H1 по Chothia в IMGT № IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) относится к каноническому классу 1, а CDR-H2 по Chothia относится к каноническому классу 2. IMGT № IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) принадлежит к подгруппе 1 тяжелой цепи человека. Примером акцепторной по-



37). CDR-L1 по Chothia IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) относится к каноническому классу 4. CDR-L2 по Chothia IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) относится к каноническому классу 1. CDR-L3 по Chothia IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) относится к каноническому классу 1. IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) относится к подгруппе 2 каппа человека.

Если выбрано более одной последовательности акцепторного антитела человека, можно использовать композит или гибрид этих акцепторов, и аминокислоты, используемые в различных положениях переменных областей гуманизированной легкой цепи и тяжелой цепи, могут быть взяты из любой используемой последовательности акцепторных антител человека. Например, человеческие зрелые переменные области тяжелой цепи AAN16432-VH\_huFrwk (SEQ ID NO: 31) и Fab гуманизированного 48G7 с кодом доступа PDB 2RCS-VH\_huFrwk (SEQ ID NO: 32) были использованы в качестве гибридных акцепторных последовательностей для гуманизации зрелой переменной области тяжелой цепи 9F5. Примерами положений, в которых эти два акцептора различаются, являются положения H1 (E или Q), H5 (V или Q), H11 (V или L), H12 (K или V), H20 (V или L), H23 (K или T), H28 (T или N), H38 (R или K), H40 (A или R), H42 (G или E), H43 (K или Q), H48 (M или I), H54 (D или N), H66 (R или K), H69 (M или I), H75 (T или S), H76 (D или N), H80 (M или L), H81 (E или Q), H83 (R или T), H108 (L или T) или H109 (V или L). Гуманизированные версии переменной области тяжелой цепи 9F5 могут включать любую аминокислоту в любом из этих положений. Последовательность зародышевой линии человека IMGT № IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 25) также использовали в качестве акцепторной последовательности для гуманизации переменной области зрелой тяжелой цепи 9F5. Например, переменные области зрелой легкой цепи человека CAB51297-VL\_huFrwk (SEQ ID NO: 35) и 1911357B-VL\_huFrwk (SEQ ID NO: 36) использовали в качестве гибридных акцепторных последовательностей для гуманизации переменной области зрелой легкой цепи 9F5. Примерами положений, в которых эти два акцептора различаются, являются положения L7 (S или A), L8 (P или A), L9 (L или F), L11 (L или N), L15 (P или L), L17 (E или T), L18 (P или S), L30 (Y или I), L31 (N или T), L54 (R или L), L60 (D или N), L66 (G или E) или L74 (K или R)). Гуманизированные версии переменной области легкой цепи 9F5 могут включать любую аминокислоту в любом из этих положений. Последовательность зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) также использовали в качестве акцепторной последовательности для гуманизации переменной области зрелой легкой цепи 9F5.

Определенные аминокислоты из остатков каркаса переменной области человека могут быть выбраны для замены на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных влияний осуществляется путем моделирования, изучения характеристик аминокислот в определенных местах или эмпирического наблюдения за эффектами замены или мутагенеза определенных аминокислот.

Например, когда аминокислота отличается между остатком каркаса переменной области мыши и выбранным остатком каркаса переменной области человека, аминокислота каркасной области человека может быть заменена эквивалентной аминокислотой каркасной области мышинового антитела, если обоснованно ожидается, что аминокислота:

- (1) нековалентно связывает антиген напрямую;
- (2) примыкает к области CDR или расположена внутри CDR согласно определению по Chothia, но не по Kabat;
- (3) иным образом взаимодействует с областью CDR (например, находится в пределах около 6 Å от области CDR) (например, идентифицируется путем моделирования легкой или тяжелой цепи на решенной структуре известной гомологичной цепи иммуноглобулина) или
- (4) представляет собой остаток, участвующий в интерфейсе VL-VH.

В одном варианте осуществления гуманизированные последовательности генерируют с использованием протокола двухэтапной ПЦР, который позволяет вводить множественные мутации, делеции и вставки с использованием сайт-направленного мутагенеза QuikChange [Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) *BioTechniques* 26:680-682)].

Каркасные остатки из классов (1)-(3) согласно определению по Queen, US 5530101, иногда поочередно называют каноническими и верньерными остатками. Каркасные остатки, которые помогают определить конформацию петли CDR, иногда называют каноническими остатками (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Thornton & Martin, *J. Mol. Biol.* 263:800-815 (1996)). Каркасные остатки, которые поддерживают конформации антигенсвязывающей петли и играют роль в точной настройке соответствия антитела антигену, иногда называют верньерными остатками (Foote & Winter, *J. Mol. Biol.* 224:487-499 (1992)).

Другие каркасные остатки, которые являются кандидатами на замену, представляют собой остатки, создающие потенциальный сайт гликозилирования. Еще другими кандидатами на замену являются акцепторные каркасные аминокислоты человека, которые необычны для иммуноглобулина человека в этом положении. Эти аминокислоты могут быть заменены аминокислотами из эквивалентного положения мышинового донорного антитела или из эквивалентных положений более типичных иммуноглобулинов человека.

Другие каркасные остатки, которые являются кандидатами на замену, представляют собой N-

концевые остатки глутамина (Q), которые могут быть заменены глутаминовой кислотой (E) для минимизации потенциала превращения пироглутамата [Y. Diana Liu, et al., 2011, J. Biol. Chem., 286: 11211-11217]. Превращение глутаминовой кислоты (E) в пироглутамат (pE) происходит медленнее, чем из глутамина (Q). По причине потери первичного амина при превращении глутамина в pE антители становятся более кислыми. Неполное превращение вызывает неоднородность антителя, которую можно наблюдать в виде множественных пиков с использованием аналитических методов, основанных на заряде. Различия в гетерогенности могут указывать на недостаточный контроль процесса.

Примерами гуманизированных переменных областей тяжелой цепи 9F5 с N-концевыми заменами глутамина на глутамат являются SEQ ID NO: 16 (hu9F5VHv2), SEQ ID NO: 17 (hu9F5VHv3), SEQ ID NO: 18 (hu9F5VHv4), SEQ ID NO: 19 (hu9F5VHv5), SEQ ID NO: 20 (hu9F5VHv6), SEQ ID NO: 21 (hu9F5VHv7), SEQ ID NO: 22 (hu9F5VHv8), SEQ ID NO: 109 (hu9F5VHv4\_L80P), SEQ ID NO: 110 (hu9F5VHv4\_L80D), SEQ ID NO: 111 (hu9F5VHv4\_L82cG), SEQ ID NO: 112 (hu9F5VHv4\_L82cD), SEQ ID NO: 113 (hu9F5VHv4\_L82P), SEQ ID NO: 114 (hu9F5VHv4\_L80G), SEQ ID NO: 115 (hu9F5VHv4\_L82K), SEQ ID NO: 116 (hu9F5VHv4\_L82R), SEQ ID NO: 117 (hu9F5VHv4\_L82E), SEQ ID NO: 118 (hu9F5VHv4\_L82N), SEQ ID NO: 119 (hu9F5VHv4\_Y79D), SEQ ID NO: 120 (hu9F5VHv4\_Y79N), SEQ ID NO: 121 (hu9F5VHv4\_Y79G), SEQ ID NO: 122 (hu9F5VHv5\_M80E), SEQ ID NO: 123 (hu9F5VHv5\_M80G), SEQ ID NO: 124 (hu9F5VHv4\_L82cS), SEQ ID NO: 125 (hu9F5VHv4\_Y79Q), SEQ ID NO: 126 (hu9F5VHv4\_S82aG), SEQ ID NO: 127 (hu9F5VHv9), SEQ ID NO: 128 (hu9F5VHv10), SEQ ID NO: 129 (hu9F5VHv10\_L82cG). Примером гуманизированной переменной области тяжелой цепи 10C12 с N-концевой заменой глутамина на глутамат является SEQ ID NO: 215 (hu10C12VHv2). Примером гуманизированной переменной области тяжелой цепи 12C4 с N-концевой заменой глутамина на глутамат является SEQ ID NO: 222 (hu12C4VHv2). Примером гуманизированной переменной области тяжелой цепи 17C12 с N-концевой заменой глутамина на глутамат является SEQ ID NO: 233 (hu17C12VHv2).

Примеры гуманизированных антителей включают гуманизированные формы мышиного 9F5, обозначенного Hu9F5.

Мышиное антитело 9F5 включает зрелые переменные области тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11, соответственно. В изобретении предложено 29 примеров гуманизированных зрелых переменных областей тяжелой цепи: hu9F5VHv1 (SEQ ID NO: 15), hu9F5VHv2 (SEQ ID NO: 16), hu9F5VHv3 (SEQ ID NO: 17), hu9F5VHv4 (SEQ ID NO: 18), hu9F5VHv5 (SEQ ID NO: 19), hu9F5VHv6 (SEQ ID NO: 20), hu9F5VHv7 (SEQ ID NO: 21), hu9F5VHv8 (SEQ ID NO: 22), hu9F5VHv4\_L80P (SEQ ID NO: 109), hu9F5VHv4\_L80D (SEQ ID NO: 110), hu9F5VHv4\_L82cG (SEQ ID NO: 111), hu9F5VHv4\_L82cD (SEQ ID NO: 112), hu9F5VHv4\_L82P (SEQ ID NO: 113), hu9F5VHv4\_L80G (SEQ ID NO: 114), hu9F5VHv4\_L82K (SEQ ID NO: 115), hu9F5VHv4\_L82R (SEQ ID NO: 116), hu9F5VHv4\_L82E (SEQ ID NO: 117), hu9F5VHv4\_L82N (SEQ ID NO: 118), hu9F5VHv4\_Y79D (SEQ ID NO: 119), hu9F5VHv4\_Y79N (SEQ ID NO: 120), hu9F5VHv4\_Y79G (SEQ ID NO: 121), hu9F5VHv5\_M80E (SEQ ID NO: 122), hu9F5VHv5\_M80G (SEQ ID NO: 123), hu9F5VHv4\_L82cS (SEQ ID NO: 124), hu9F5VHv4\_Y79Q (SEQ ID NO: 125), hu9F5VHv4\_S82aG (SEQ ID NO: 126), hu9F5VHv9 (SEQ ID NO: 127), hu9F5VHv10 (SEQ ID NO: 128) и hu9F5VHv10\_L82cG (SEQ ID NO: 129). В изобретении дополнительно предложено 95 примеров зрелых переменных областей легкой цепи hu9F5VLv1 (SEQ ID NO: 23), hu9F5VLv2 (SEQ ID NO: 24), hu9F5VLv3 (SEQ ID NO: 25), hu9F5VLv4 (SEQ ID NO: 26), hu9F5VLv5 (SEQ ID NO: 27), hu9F5VLv6 (SEQ ID NO: 28), hu9F5VLv7 (SEQ ID NO: 29), hu9F5VLv8 (SEQ ID NO: 130), hu9F5VLv9 (SEQ ID NO: 131), hu9F5VLv2\_M51E (SEQ ID NO: 61), hu9F5VLv2\_M51D (SEQ ID NO: 62), hu9F5VLv2\_L27cD (SEQ ID NO: 63), hu9F5VLv2\_L27cG (SEQ ID NO: 64), hu9F5VLv2\_L27cS (SEQ ID NO: 65), hu9F5VLv2\_L27cE (SEQ ID NO: 66), hu9F5VLv2\_L30E (SEQ ID NO: 67), hu9F5VLv2\_L30K (SEQ ID NO: 68), hu9F5VLv2\_L27cT (SEQ ID NO: 69), hu9F5VLv2\_L27cN (SEQ ID NO: 70), hu9F5VLv2\_L27bD (SEQ ID NO: 71), hu9F5VLv2\_L30G (SEQ ID NO: 72), hu9F5VLv2\_L33N (SEQ ID NO: 73), hu9F5VLv2\_L27cA (SEQ ID NO: 74), hu9F5VLv2\_L33T (SEQ ID NO: 75), hu9F5VLv2\_L33S (SEQ ID NO: 76), hu9F5VLv2\_L33R (SEQ ID NO: 77), hu9F5VLv2\_L30Q (SEQ ID NO: 78), hu9F5VLv2\_L27bT (SEQ ID NO: 79), hu9F5VLv2\_T31G (SEQ ID NO: 80), hu9F5VLv2\_L27bQ (SEQ ID NO: 81), hu9F5VLv2\_L33G (SEQ ID NO: 82), hu9F5VLv2\_L27cP (SEQ ID NO: 83), hu9F5VLv2\_V78R (SEQ ID NO: 84), hu9F5VLv2\_I75D (SEQ ID NO: 85), hu9F5VLv2\_V78D (SEQ ID NO: 86), hu9F5VLv2\_V78E (SEQ ID NO: 87), hu9F5VLv2\_V78P (SEQ ID NO: 88), hu9F5VLv2\_V78K (SEQ ID NO: 89), hu9F5VLv2\_R77D (SEQ ID NO: 90), hu9F5VLv2\_V78G (SEQ ID NO: 91), hu9F5VLv2\_S76P (SEQ ID NO: 92), hu9F5VLv2\_I75P (SEQ ID NO: 93), hu9F5VLv2\_I75Q (SEQ ID NO: 94), hu9F5VLv2\_I75G (SEQ ID NO: 95), hu9F5VLv2\_L73P (SEQ ID NO: 96), hu9F5VLv2\_L73G (SEQ ID NO: 97), hu9F5VLv2\_V78Q (SEQ ID NO: 98), hu9F5VLv2\_S76G (SEQ ID NO: 99), hu9F5VLv2\_L92D (SEQ ID NO: 100), hu9F5VLv2\_Y86T (SEQ ID NO: 101), hu9F5VLv2\_L92E (SEQ ID NO: 102), hu9F5VLv2\_L92G (SEQ ID NO: 103), hu9F5VLv2\_L92Q (SEQ ID NO: 104), hu9F5VLv2\_L93G (SEQ ID NO: 105), hu9F5VLv2\_V85G (SEQ ID NO: 106), hu9F5VLv2\_L92T (SEQ ID NO: 107), hu9F5VLv2\_A89G (SEQ ID NO: 108), hu9F5VLv8\_DIM1 (SEQ ID NO: 132), hu9F5VLv8\_DIM2 (SEQ ID NO: 133), hu9F5VLv8\_DIM3 (SEQ ID NO: 134), hu9F5VLv8\_DIM4 (SEQ ID NO: 135), hu9F5VLv8\_DIM5 (SEQ ID NO: 136), hu9F5VLv8\_DIM6 (SEQ ID NO: 137), hu9F5VLv8\_DIM7 (SEQ ID NO: 138), hu9F5VLv8\_DIM8 (SEQ ID

NO: 139), hu9F5VLv8\_DIM9 (SEQ ID NO: 140), hu9F5VLv8\_DIM10 (SEQ ID NO: 141), hu9F5VLv8\_DIM11 (SEQ ID NO: 142), hu9F5VLv8\_DIM12 (SEQ ID NO: 143), hu9F5VLv8\_DIM13 (SEQ ID NO: 144), hu9F5VLv8\_DIM14 (SEQ ID NO: 145), hu9F5VLv8\_DIM15 (SEQ ID NO: 146), hu9F5VLv8\_DIM16 (SEQ ID NO: 147), hu9F5VLv8\_DIM17 (SEQ ID NO: 148), hu9F5VLv8\_DIM18 (SEQ ID NO: 149), hu9F5VLv8\_DIM19 (SEQ ID NO: 150), hu9F5VLv8\_DIM20 (SEQ ID NO: 151), hu9F5VLv8\_DIM21 (SEQ ID NO: 152), hu9F5VLv8\_DIM22 (SEQ ID NO: 153), hu9F5VLv8\_DIM23 (SEQ ID NO: 154), hu9F5VLv8\_DIM24 (SEQ ID NO: 155), hu9F5VLv8\_DIM25 (SEQ ID NO: 156), hu9F5VLv8\_DIM26 (SEQ ID NO: 157), hu9F5VLv8\_DIM27 (SEQ ID NO: 158), hu9F5VLv8\_DIM28 (SEQ ID NO: 159), hu9F5VLv8\_DIM29 (SEQ ID NO: 160), hu9F5VLv8\_DIM30 (SEQ ID NO: 161), hu9F5VLv9\_DIM1 (SEQ ID NO: 162), hu9F5VLv9\_DIM2 (SEQ ID NO: 163), hu9F5VLv9\_DIM4 (SEQ ID NO: 164), hu9F5VLv9\_DIM5 (SEQ ID NO: 165), hu9F5VLv9\_DIM8 (SEQ ID NO: 166), hu9F5VLv9\_DIM10 (SEQ ID NO: 167), hu9F5VLv9\_DIM11 (SEQ ID NO: 168), hu9F5VLv9\_DIM13 (SEQ ID NO: 169), hu9F5VLv9\_DIM19 (SEQ ID NO: 170) и hu9F5VLv9\_DIM20 (SEQ ID NO: 171). На фиг. 1A-1B и 4A-4B показано выравнивание варибельной области тяжелой цепи мышиного 9F5 и различных гуманизированных антител. На фиг. 2A-2B и 5A-5B показано выравнивание варибельной области легкой цепи мышиного 9F5 и различных гуманизированных антител. На фиг. 6A-6C показано выравнивание варибельной области легкой цепи гуманизированного варианта hu9F5VLv8 и различных гуманизированных антител.

По таким причинам, как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, место для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, необычный остаток для своего положения в последовательности варибельной области человека и вследствие этого потенциальной иммуногенности, снижение потенциала агрегации и по другим причинам следующие 48 положений каркаса варибельной области были рассмотрены в качестве кандидатов для замены в 95 примерах зрелых варибельных областей легкой цепи человека и 29 примерах зрелых варибельных областей тяжелой цепи человека, как далее указано в примерах: L3 (V3Q), L7 (A7S), L8 (A8P), L9 (F9L), L11 (N11L), L15 (L15P), L17 (T17E), L18 (S18P), L37 (L37Q, L37G, L37I), L39 (R39K), L60 (N60D), L64 (G64S), L66 (E66G), L73 (L73P, L73G), L74 (R74K), L75 (I75D, I75P, I75Q, I75G), L76 (S76P, S76G), L77 (R77D), L78 (V78R, V78D, V78E, V78P, V78K, V78G, V78Q), L85 (V85G), L86 (Y86T), L100 (G100Q), H1 (Q1E), H5 (Q5V), H11 (L11V), H12 (V12K), H17 (S17T), H20 (L20I), H23 (T23K), H38 (K38R, K38Q), H40 (R40A), H42 (E42G), H43 (Q43K), H48 (I48M), H66 (K66R), H69 (I69M), H75 (S75T), H76 (N76D), H79 (Y79Q, Y79D, Y79N, Y79G), H80 (L80M, L80P, L80D, L80G, L80E), H81 (Q81E), H82 (L82P, L82K, L82R, L82E, L82N), H82a (S82aG), H82c (L82cG, L82cD, L82cS), H83 (T83R), H93 (A93T), H94 (S94T), H108 (T108L) и H109 (L109V). Следующие 14 положений CDR варибельной области были рассмотрены в качестве кандидатов на замену в 95 примерах зрелых варибельных областей легкой цепи человека и 29 примерах зрелых варибельных областей тяжелой цепи человека, как указано далее в примерах: L27b (L27bD, L27bT, L27bQ), L27c (L27cD, L27cG, L27cS, L27cE, L27cT, L27cN, L27cA, L27cP, L27cI), L30 (I30Y, I30E, I30K, I30G, DOQ), L31 (T31N, T31G), L33 (L33N, L33T, L33S, L33R, L33G), L51 (M51G, M51E, M51D, M51K, M51I), L54 (L54R, L54G, L54T), L89 (A89G), L92 (L92D, L92E, L92G, L92Q, L92T, L92I), L93 (E93G), H28 (N28T), H51 (I48M), H54 (N54D) и H56 (D56E). В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 50. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 50, а CDR-H2 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 51. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-H2 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 51. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-H2 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 52. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-L2 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 55. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-L1 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 53, а CDR-L2 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 55. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-L1 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 54, а CDR-L2 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 55. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-L1 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 172-193. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-L2 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 194-205. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-L3 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 206-213.

Здесь, как и в других местах, первый упомянутый остаток является остатком гуманизированного антитела, образованного путем прививки CDR по Kabat или CDR согласно композитному определению по Chothia-Kabat в случае CDR-H1 акцепторному каркасу человека, а второй упомянутый остаток явля-

ется остатком, рассматриваемым для замены такого остатка. Таким образом, в пределах каркасов вариабельной области первым упомянутым остатком является человеческий, а в пределах CDR первым упомянутым остатком является мышинный.

Приведенные в качестве примера антитела включают любые перестановки или комбинации приведенных в качестве примера зрелых вариабельных областей тяжелой и легкой цепей hu9F5VHv1/hu9F5VLv1, hu9F5VHv1/hu9F5VLv2, hu9F5VHv1/hu9F5VLv3, hu9F5VHv1/hu9F5VLv4, hu9F5VLv1/hu9F5VLv5, hu9F5VHv1/hu9F5VLv6, hu9F5VHv1/hu9F5VLv7, hu9F5VHv2/hu9F5VLv1, hu9F5VHv2/hu9F5VLv2, hu9F5VHv2/hu9F5VLv3, hu9F5VHv2/hu9F5VLv4, hu9F5VLv2/hu9F5VLv5, hu9F5VHv2/hu9F5VLv6, hu9F5VHv2/hu9F5VLv7, hu9F5VHv3/hu9F5VLv1, hu9F5VHv3/hu9F5VLv2, hu9F5VHv3/hu9F5VLv3, hu9F5VHv3/hu9F5VLv4, hu9F5VLv3/hu9F5VLv5, hu9F5VHv3/hu9F5VLv6, hu9F5VHv3/hu9F5VLv7, hu9F5VHv4/hu9F5VLv1, hu9F5VHv4/hu9F5VLv2, hu9F5VHv4/hu9F5VLv3, hu9F5VHv4/hu9F5VLv4, hu9F5VLv4/hu9F5VLv5, hu9F5VHv4/hu9F5VLv6, hu9F5VHv4/hu9F5VLv7, hu9F5VHv5/hu9F5VLv1, hu9F5VHv5/hu9F5VLv2, hu9F5VHv5/hu9F5VLv3, hu9F5VHv5/hu9F5VLv4, hu9F5VLv5/hu9F5VLv5, hu9F5VHv5/hu9F5VLv6, hu9F5VHv5/hu9F5VLv7, hu9F5VHv6/hu9F5VLv1, hu9F5VHv6/hu9F5VLv2, hu9F5VHv6/hu9F5VLv3, hu9F5VHv6/hu9F5VLv4, hu9F5VHv6/hu9F5VLv5, hu9F5VHv6/hu9F5VLv6, hu9F5VHv6/hu9F5VLv7, hu9F5VHv7/hu9F5VLv1, hu9F5VHv7/hu9F5VLv2, hu9F5VHv7/hu9F5VLv3, hu9F5VHv7/hu9F5VLv4, hu9F5VLv7/hu9F5VLv5, hu9F5VHv7/hu9F5VLv6, hu9F5VHv7/hu9F5VLv7, hu9F5VHv8/hu9F5VLv1, hu9F5VHv8/hu9F5VLv2, hu9F5VHv8/hu9F5VLv3, hu9F5VHv8/hu9F5VLv4, hu9F5VLv8/hu9F5VLv5, hu9F5VHv8/hu9F5VLv6, hu9F5VHv8/hu9F5VLv7.

Приведенные в качестве примера антитела включают любые перестановки или комбинации приведенных в качестве примера зрелых вариабельных областей тяжелой и легкой цепей hu9F5VHv1 (SEQ ID NO: 15), hu9F5VHv2 (SEQ ID NO: 16), hu9F5VHv3 (SEQ ID NO: 17), hu9F5VHv4 (SEQ ID NO: 18), hu9F5VHv5 (SEQ ID NO: 19), hu9F5VHv6 (SEQ ID NO: 20), hu9F5VHv7 (SEQ ID NO: 21), hu9F5VHv8 (SEQ ID NO: 22), hu9F5VHv9 (SEQ ID NO: 127), hu9F5VHv10 (SEQ ID NO: 128), hu9F5VHv10\_L82cG (SEQ ID NO: 129), hu9F5VHv4\_L80P (SEQ ID NO: 109), hu9F5VHv4\_L80D (SEQ ID NO: 110), hu9F5VHv4\_L82cG (SEQ ID NO: 111), hu9F5VHv4\_L82cD (SEQ ID NO: 112), hu9F5VHv4\_L82P (SEQ ID NO: 113), hu9F5VHv4\_L80G (SEQ ID NO: 114), hu9F5VHv4\_L82K (SEQ ID NO: 115), hu9F5VHv4\_L82R (SEQ ID NO: 116), hu9F5VHv4\_L82E (SEQ ID NO: 117), hu9F5VHv4\_L82N (SEQ ID NO: 118), hu9F5VHv4\_Y79D (SEQ ID NO: 119), hu9F5VHv4\_Y79N (SEQ ID NO: 120), hu9F5VHv4\_Y79G (SEQ ID NO: 121), hu9F5VHv5\_M80E (SEQ ID NO: 122), hu9F5VHv5\_M80G (SEQ ID NO: 123), hu9F5VHv4\_L82Cs (SEQ ID NO: 124), hu9F5VHv4\_Y79Q (SEQ ID NO: 125) и hu9F5VHv4\_S82aG (SEQ ID NO: 126), с любой из приведенных в качестве примера зрелых вариабельных областей легкой цепи hu9F5VLv1 (SEQ ID NO: 23), hu9F5VLv2 (SEQ ID NO: 24), hu9F5VLv3 (SEQ ID NO: 25), hu9F5VLv4 (SEQ ID NO: 26), hu9F5VLv5 (SEQ ID NO: 27), hu9F5VLv6 (SEQ ID NO: 28), hu9F5VLv7 (SEQ ID NO: 29), hu9F5VLv8 (SEQ ID NO: 130), hu9F5VLv9 (SEQ ID NO: 131), hu9F5VLv2\_M51E (SEQ ID NO: 61), hu9F5VLv2\_M51D (SEQ ID NO: 62), hu9F5VLv2\_L27cD (SEQ ID NO: 63), hu9F5VLv2\_L27cG (SEQ ID NO: 64), hu9F5VLv2\_L27cS (SEQ ID NO: 65), hu9F5VLv2\_L27cE (SEQ ID NO: 66), hu9F5VLv2\_I30E (SEQ ID NO: 67), hu9F5VLv2\_I30K (SEQ ID NO: 68), hu9F5VLv2\_L27cT (SEQ ID NO: 69), hu9F5VLv2\_L27cN (SEQ ID NO: 70), hu9F5VLv2\_L27bD (SEQ ID NO: 71), hu9F5VLv2\_I30G, (SEQ ID NO: 72), hu9F5VLv2\_L33N (SEQ ID NO: 73), hu9F5VLv2\_L27cA (SEQ ID NO: 74), hu9F5VLv2\_L33T (SEQ ID NO: 75), hu9F5VLv2\_L33S (SEQ ID NO: 76), hu9F5VLv2\_L33R (SEQ ID NO: 77), hu9F5VLv2\_I30Q (SEQ ID NO: 78), hu9F5VLv2\_L27bT (SEQ ID NO: 79), hu9F5VLv2\_T31G (SEQ ID NO: 80), hu9F5VLv2\_L27bQ (SEQ ID NO: 81), hu9F5VLv2\_L33G (SEQ ID NO: 82), hu9F5VLv2\_L27cP (SEQ ID NO: 83), hu9F5VLv2\_V78R (SEQ ID NO: 84), hu9F5VLv2\_I75D (SEQ ID NO: 85), hu9F5VLv2\_V78D (SEQ ID NO: 86), hu9F5VLv2\_V78E (SEQ ID NO: 87), hu9F5VLv2\_V78P (SEQ ID NO: 88), hu9F5VLv2\_V78K (SEQ ID NO: 89), hu9F5VLv2\_R77D (SEQ ID NO: 90), hu9F5VLv2\_V78G (SEQ ID NO: 91), hu9F5VLv2\_S76P (SEQ ID NO: 92), hu9F5VLv2\_I75P (SEQ ID NO: 93), hu9F5VLv2\_I75Q (SEQ ID NO: 94), hu9F5VLv2\_I75G (SEQ ID NO: 95), hu9F5VLv2\_L73P (SEQ ID NO: 96), hu9F5VLv2\_L73G (SEQ ID NO: 97), hu9F5VLv2\_V78Q (SEQ ID NO: 98), hu9F5VLv2\_S76G (SEQ ID NO: 99), hu9F5VLv2\_L92D (SEQ ID NO: 100), hu9F5VLv2\_Y86T (SEQ ID NO: 101), hu9F5VLv2\_L92E (SEQ ID NO: 102), hu9F5VLv2\_L92G (SEQ ID NO: 103), hu9F5VLv2\_L92Q (SEQ ID NO: 104), hu9F5VLv2\_L93G (SEQ ID NO: 105), hu9F5VLv2\_V85G (SEQ ID NO: 106), hu9F5VLv2\_L92T (SEQ ID NO: 107), hu9F5VLv2\_A89G (SEQ ID NO: 108), hu9F5VLv8\_DIM1 (SEQ ID NO: 132), hu9F5VLv8\_DIM2 (SEQ ID NO: 133), hu9F5VLv8\_DIM3 (SEQ ID NO: 134), hu9F5VLv8\_DIM4 (SEQ ID NO: 135), hu9F5VLv8\_DIM5 (SEQ ID NO: 136), hu9F5VLv8\_DIM6 (SEQ ID NO: 137), hu9F5VLv8\_DIM7 (SEQ ID NO: 138), hu9F5VLv8\_DIM8 (SEQ ID NO: 139), hu9F5VLv8\_DIM9 (SEQ ID NO: 140), hu9F5VLv8\_DIM10 (SEQ ID NO: 141), hu9F5VLv8\_DIM11 (SEQ ID NO: 142), hu9F5VLv8\_DIM12 (SEQ ID NO: 143), hu9F5VLv8\_DIM13 (SEQ ID NO: 144), hu9F5VLv8\_DIM14 (SEQ ID NO: 145), hu9F5VLv8\_DIM15 (SEQ ID NO: 146), hu9F5VLv8\_DIM16 (SEQ ID NO: 147), hu9F5VLv8\_DIM17 (SEQ ID NO: 148), hu9F5VLv8\_DIM18 (SEQ ID NO: 149), hu9F5VLv8\_DIM19 (SEQ ID NO: 150), hu9F5VLv8\_DIM20 (SEQ ID NO: 151), hu9F5VLv8\_DIM21 (SEQ ID NO: 152), hu9F5VLv8\_DIM22 (SEQ ID NO: 153), hu9F5VLv8\_DIM23 (SEQ ID NO: 154), hu9F5VLv8\_DIM24 (SEQ ID NO: 155), hu9F5VLv8\_DIM25 (SEQ ID NO: 156), hu9F5VLv8\_DIM26 (SEQ ID NO: 157),



(SEQ ID NO: 17), hu9F5VHv4 (SEQ ID NO: 18), hu9F5VHv5 (SEQ ID NO: 19), hu9F5VHv6 (SEQ ID NO: 20), hu9F5VHv7 (SEQ ID NO: 21), hu9F5VHv8 (SEQ ID NO: 22), hu9F5VHv9 (SEQ ID NO: 127), hu9F5VHv10 (SEQ ID NO: 128), hu9F5VHv10\_L82cG (SEQ ID NO: 129), hu9F5VHv4\_L80P (SEQ ID NO: 109), hu9F5VHv4\_L80D (SEQ ID NO: 110), hu9F5VHv4\_L82cG (SEQ ID NO: 111), hu9F5VHv4\_L82cD (SEQ ID NO: 112), hu9F5VHv4\_L82P (SEQ ID NO: 113), hu9F5VHv4\_L80G (SEQ ID NO: 114), hu9F5VHv4\_L82K (SEQ ID NO: 115), hu9F5VHv4\_L82R (SEQ ID NO: 116), hu9F5VHv4\_L82E (SEQ ID NO: 117), hu9F5VHv4\_L82N (SEQ ID NO: 118), hu9F5VHv4\_Y79D (SEQ ID NO: 119), hu9F5VHv4\_Y79N (SEQ ID NO: 120), hu9F5VHv4\_Y79G (SEQ ID NO: 121), hu9F5VHv5\_M80E (SEQ ID NO: 122), hu9F5VHv5\_M80G (SEQ ID NO: 123), hu9F5VHv4\_L82Cs (SEQ ID NO: 124), hu9F5VHv4\_Y79Q (SEQ ID NO: 125) или hu9F5VHv4\_S82aG (SEQ ID NO: 126), и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu9F5VLv1 (SEQ ID NO: 23), hu9F5VLv2 (SEQ ID NO: 24), hu9F5VLv3 (SEQ ID NO: 25), hu9F5VLv4 (SEQ ID NO: 26), hu9F5VLv5 (SEQ ID NO: 27), hu9F5VLv6 (SEQ ID NO: 28), hu9F5VLv7 (SEQ ID NO: 29), hu9F5VLv8 (SEQ ID NO: 130), hu9F5VLv9 (SEQ ID NO: 131), hu9F5VLv2\_M51E (SEQ ID NO: 61), hu9F5VLv2\_M51D (SEQ ID NO: 62), hu9F5VLv2\_L27cD (SEQ ID NO: 63), hu9F5VLv2\_L27cG (SEQ ID NO: 64), hu9F5VLv2\_L27cS (SEQ ID NO: 65), hu9F5VLv2\_L27cE (SEQ ID NO: 66), hu9F5VLv2\_I30E (SEQ ID NO: 67), hu9F5VLv2\_I30K (SEQ ID NO: 68), hu9F5VLv2\_L27cT (SEQ ID NO: 69), hu9F5VLv2\_L27cN (SEQ ID NO: 70), hu9F5VLv2\_L27bD (SEQ ID NO: 71), hu9F5VLv2\_I30G (SEQ ID NO: 72), hu9F5VLv2\_L33N (SEQ ID NO: 73), hu9F5VLv2\_L27cA (SEQ ID NO: 74), hu9F5VLv2\_L33T (SEQ ID NO: 75), hu9F5VLv2\_L33S (SEQ ID NO: 76), hu9F5VLv2\_L33R (SEQ ID NO: 77), hu9F5VLv2\_I30Q (SEQ ID NO: 78), hu9F5VLv2\_L27bT (SEQ ID NO: 79), hu9F5VLv2\_T31G (SEQ ID NO: 80), hu9F5VLv2\_L27bQ (SEQ ID NO: 81), hu9F5VLv2\_L33G (SEQ ID NO: 82), hu9F5VLv2\_L27cP (SEQ ID NO: 83), hu9F5VLv2\_V78R (SEQ ID NO: 84), hu9F5VLv2\_I75D (SEQ ID NO: 85), hu9F5VLv2\_V78D (SEQ ID NO: 86), hu9F5VLv2\_V78E (SEQ ID NO: 87), hu9F5VLv2\_V78P (SEQ ID NO: 88), hu9F5VLv2\_V78K (SEQ ID NO: 89), hu9F5VLv2\_R77D (SEQ ID NO: 90), hu9F5VLv2\_V78G (SEQ ID NO: 91), hu9F5VLv2\_S76P (SEQ ID NO: 92), hu9F5VLv2\_I75P (SEQ ID NO: 93), hu9F5VLv2\_I75Q (SEQ ID NO: 94), hu9F5VLv2\_I75G (SEQ ID NO: 95), hu9F5VLv2\_L73P (SEQ ID NO: 96), hu9F5VLv2\_L73G (SEQ ID NO: 97), hu9F5VLv2\_V78Q (SEQ ID NO: 98), hu9F5VLv2\_S76G (SEQ ID NO: 99), hu9F5VLv2\_L92D (SEQ ID NO: 100), hu9F5VLv2\_Y86T (SEQ ID NO: 101), hu9F5VLv2\_L92E (SEQ ID NO: 102), hu9F5VLv2\_L92G (SEQ ID NO: 103), hu9F5VLv2\_L92Q (SEQ ID NO: 104), hu9F5VLv2\_L93G (SEQ ID NO: 105), hu9F5VLv2\_V85G (SEQ ID NO: 106), hu9F5VLv2\_L92T (SEQ ID NO: 107), hu9F5VLv2\_A89G (SEQ ID NO: 108), hu9F5VLv8\_DIM1 (SEQ ID NO: 132), hu9F5VLv8\_DIM2 (SEQ ID NO: 133), hu9F5VLv8\_DIM3 (SEQ ID NO: 134), hu9F5VLv8\_DIM4 (SEQ ID NO: 135), hu9F5VLv8\_DIM5 (SEQ ID NO: 136), hu9F5VLv8\_DIM6 (SEQ ID NO: 137), hu9F5VLv8\_DIM7 (SEQ ID NO: 138), hu9F5VLv8\_DIM8 (SEQ ID NO: 139), hu9F5VLv8\_DIM9 (SEQ ID NO: 140), hu9F5VLv8\_DIM10 (SEQ ID NO: 141), hu9F5VLv8\_DIM11 (SEQ ID NO: 142), hu9F5VLv8\_DIM12 (SEQ ID NO: 143), hu9F5VLv8\_DIM13 (SEQ ID NO: 144), hu9F5VLv8\_DIM14 (SEQ ID NO: 145), hu9F5VLv8\_DIM15 (SEQ ID NO: 146), hu9F5VLv8\_DIM16 (SEQ ID NO: 147), hu9F5VLv8\_DIM17 (SEQ ID NO: 148), hu9F5VLv8\_DIM18 (SEQ ID NO: 149), hu9F5VLv8\_DIM19 (SEQ ID NO: 150), hu9F5VLv8\_DIM20 (SEQ ID NO: 151), hu9F5VLv8\_DIM21 (SEQ ID NO: 152), hu9F5VLv8\_DIM22 (SEQ ID NO: 153), hu9F5VLv8\_DIM23 (SEQ ID NO: 154), hu9F5VLv8\_DIM24 (SEQ ID NO: 155), hu9F5VLv8\_DIM25 (SEQ ID NO: 156), hu9F5VLv8\_DIM26 (SEQ ID NO: 157), hu9F5VLv8\_DIM27 (SEQ ID NO: 158), hu9F5VLv8\_DIM28 (SEQ ID NO: 159), hu9F5VLv8\_DIM29 (SEQ ID NO: 160), hu9F5VLv8\_DIM30 (SEQ ID NO: 161), hu9F5VLv9\_DIM1 (SEQ ID NO: 162), hu9F5VLv9\_DIM2 (SEQ ID NO: 163), hu9F5VLv9\_DIM4 (SEQ ID NO: 164), hu9F5VLv9\_DIM5 (SEQ ID NO: 165), hu9F5VLv9\_DIM8 (SEQ ID NO: 166), hu9F5VLv9\_DIM10 (SEQ ID NO: 167), hu9F5VLv9\_DIM11 (SEQ ID NO: 168), hu9F5VLv9\_DIM13 (SEQ ID NO: 169), hu9F5VLv9\_DIM19 (SEQ ID NO: 170) или hu9F5VLv9\_DIM20 (SEQ ID NO: 171). В некоторых таких антителах по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 или все 62 положения подверженные обратным мутациям или другим мутациям в SEQ ID NO: 15-22, 109-129, SEQ ID NO: 23-29, SEQ ID NO: 61-108 и SEQ ID NO: 130-171, аналогичным образом подвергнуты обратной мутации или другим мутациям. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H1 занято E, H17 занято T, H20 занято I, H69 занято M, H75 занято T, H93 занято T, H94 занято T, а H109 занято V. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H1, H17, H20, H69, H75, H94 и H109 заняты E, T, I, M, T, T, T и V соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H66 занято R, а H81 занято E. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H66 и H81 заняты R и E соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H23 занято I, а H83 занято R. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H23 и H83 заняты K и R соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H43 занято K, H51 занято V, H76 занято D, M80 занято M, а H108 занято L. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H43, H51, H76, H80 и H108 заняты K, V, D, M и L соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H28 в области VH занято T.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H54 занято D, а H56 занято E. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H54 и H56 заняты D и E соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H40 в области VH занято A. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H5 занято V, H11 занято V, H12 занято K, H38 занято R, а H42 занято G.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H5, H11, H12, H38 и H42 заняты V, V, K, R и G соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H1 занято Q или E, H5 занято Q или V, H11 занято L или V, H12 занято V или K, H17 занято S или T, H20 занято L или I, H23 занято T или K, H28 занято N или T, H38 занято K, R или Q, H40 занято R или A, H42 занято E или G, H43 занято Q или K, H48 занято I или M, H51 занято I или V, H54 занято N или D, H56 занято D или E, H66 занято K или R, H69 занято I или M, H75 занято S или T, H76 занято N или D, H79 занято Y, Q, D, N или G, H80 занято L, M, P, D, G или E, H81 занято Q или E, H82 занято L, P, K, R, E или N, H82a занято S или G, H82c занято L, G, D или S, H83 занято T или R, H93 занято A или T, H94 занято S или T, H108 занято T или L, H109 занято L или V.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H1, H17, H20, H69, H75, H93, H94 и H109 в области VH заняты E, T, I, M, T, T, T и V, соответственно, как в hu9F5VHv2. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H1, H17, H20, H66, H69, H75, H81, H93, H94 и H109 в области VH заняты E, T, I, R, M, T, E, T, T и V, соответственно, как в hu9F5VHv3. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H1, H17, H20, H23, H28, H66, H69, H75, H81, H83, H93, H94 и H109 в области VH заняты E, T, I, K, T, R, M, T, E, R, T, T и V, соответственно, как в hu9F5VHv4. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H1, H17, H20, H23, H28, H43, H51, H54, H56, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, T, I, K, T, K, V, D, E, R, M, T, D, M, E, R, T, T, L и V, соответственно, как в hu9F5VHv5. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H1, H17, H20, H23, H28, H40, H43, H48, H51, H54, H56, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, T, I, K, T, A, K, M, V, D, E, R, M, T, D, M, E, R, T, T, L и V, соответственно, как в hu9F5VHv6. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H40, H42, H43, H51, H54, H56, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, K, T, I, K, R, A, G, K, V, D, E, R, M, T, D, M, E, R, T, T, L и V, соответственно, как в hu9F5VHv7. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H40, H42, H43, H51, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, K, T, I, K, R, A, G, K, V, R, M, T, D, M, E, R, T, T, L и V, соответственно, как в hu9F5VHv8. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H69, H75, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, K, T, I, K, Q, G, K, R, M, T, M, E, R, T, T, L и V, соответственно, как в hu9F5VHv9. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H69, H75, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, K, T, I, K, K, E, K, R, M, T, M, E, R, T, T, L и V, соответственно, как в hu9F5VHv10. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H69, H75, H80, H81, H82c, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, K, T, I, K, K, E, K, R, M, T, M, E, G, R, T, T, L и V, соответственно, как в hu9F5VHv10\_L82cG.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L7 занято S, L8 занято P, L15 занято P, а L100 занято Q. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения L7, L8, L15 и L100 заняты S, P, P и Q соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L66 в области VL занято G. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L64 в области VL занято S.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L17 в области VL занято E.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L11 занято L, L51 занято G, а L54 занято R. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения L11, L51 и L54 заняты L, G и R соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L30 в области VL занято Y.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L3 занято V или Q, L7 занято A или S, L8 занято A или P, L9 занято F или L, L11 занято N или L, L15 занято L или P, L17 занято T или E, L18 занято S или P, L27b занято L, D, T или Q, L27c занято L, D, G, S, E, T, N, A, P или I, L30 занято I, Y, E, K, G или Q, L31 занято T, N или G, L33 занято L, N, T, S, R или G, L37 занято L, Q, G или I, L39 занято R или K, L51 занято M, G, E, D, K или I, L54 занято L, R, G или T, L60 занято N или D, L64 занято G или S, L66 занято E или G, L73 занято L, P или G, L74 занято R или K, L75 занято I, D, P, Q или G, L76 занято S, P или G, L77 занято SEQ ID NO: 146 или D, L78 занято V, R, D, E, P, K, G или Q, L85 занято V или G, L86 занято Y или T, L89 занято A или G, L92 занято L, D, E, G, Q, T или I, L93 занято E или G, L100 занято G или Q.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения L64 и L66 в области VL заняты S и G, соответственно, как в hu9F5VLv1. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения L7, L8, L15, L64, L66 и L100 в области VL заняты S, P, P, S, G и Q, соответственно, как в hu9F5VLv2. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения L7, L8, L15, L17, L66 и L100 в области VL заняты S, P, P, E, G и Q, соответственно, как в hu9F5VLv3.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения L7, L8, L11, L15, L17, L51, L54, L66 и L100 в области VL заняты S, P, L, P, E, G, R, G и Q, соответственно, как в hu9F5VLv4. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область легкой цепи содержит любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 133, 135-137, 142-144, 149, 158, 159 и 168. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения L7, L8, L11, L15, L17, L30, L51, L54, L66 и L100 в области VL заняты S, P, L, P, E, Y, G, R, G и Q, соответственно, как в hu9F5VLv5. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения L7, L8, L11, L15, L17, L30, L51, L54 и L100 в области VL заняты S, P, L, P, E, Y, G, R и Q, соответственно, как в hu9F5VLv6. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения L7, L8, L9, L11, L15, L17, L18, L31, L39, L51, L54, L60, L66, L74 и L100 в области VL заняты S, P, L, L, P, E, P, N, K, G, R, D, G, K и Q, соответственно, как в hu9F5VLv7.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения L7, L8, L11, L15, L17, L39, L64, L66, L74 и L100 в области VL заняты S, P, L, P, E, K, S, G, K и Q, соответственно, как в hu9F5VLv8. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L3 в области VL занято Q. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято D, G, I, L или S, положение L37 в области VL занято G, I, L или Q, положение L51 в области VL занято E, G, I, K или M, положение L54 в области VL занято G, L, R или T, а положение L92 в области VL занято G, I или L. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято D или S, положение L37 в области VL занято G, L или Q, положение L51 в области VL занято G или K, положение L54 в области VL занято R, а положение L92 в области VL занято I.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято D, положение L37 в области VL занято G, а положение L51 в области VL занято G. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 127, а вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 149.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято D, положение L37 в области VL занято, Q а положение L51 в области VL занято G. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 127, а вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 137.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято S, положение L37 в области VL занято L, а положение L51 в области VL занято G. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 127, а вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 159.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято D, положение L37 в области VL занято Q а положение L51 в области VL занято K.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 127, а вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 138.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято S положение L37 в области VL занято, Q а положение L51 в области VL занято G. В некоторых гуманизированных

антителах 9F5 вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 127, а вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 133.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положения L7, L8, L11, L15, L17, L39, L60, L64, L66, L74 и L100 в области VL заняты S, P, L, P, E, K, D, S, G, K и Q, соответственно, как в hu9F5VLv9. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L3 в области VL занято Q.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято G или S, положение L37 в области VL занято G, I или Q, положение L51 в области VL занято G, I или K, положение L54 в области VL занято G или R, а положение L92 в области VL занято G, I или L. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято G, положение L37 в области VL занято G, положение L51 в области VL занято G, а положение L54 в области VL занято R. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L92 в области VL занято I. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 129, а вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 168.

Вариабельная область легкой цепи любого из вышеупомянутых антител может быть модифицирована для дальнейшего снижения иммуногенности. Например, в некоторых гуманизированных антителах положение L27b в области VL занято D, T или Q; положение L27c в области VL занято D, G, S, E, T, N, A, I или P; положение L30 в области VL занято E, K, G или Q; положение L31 в области VL занято G; положение L33 в области VL занято N, T, S, R или G; положение L37 в области VL занято Q, G или I, положение L51 в области VL занято E, D, G, K или I; положение L54 в области VL занято G, R или T, положение L60 в области VL занято D, положение L73 в области VL занято P или G; положение L75 в области VL занято D, P, Q или G; положение L76 в области VL занято P или G; положение L77 в области VL занято D; положение L78 в области VL занято R, D, E, P, K, G или Q; положение L85 в области VL занято G; положение L86 в области VL занято T; положение L89 в области VL занято G; положение L92 в области VL занято D, E, G, Q, I или T; и/или положение L93 в области VL занято G (нумерация по Kabat).

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L51 в области VL занято E, как в hu9F5VLv2\_M51E. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L51 в области VL занято D, как в hu9F5VLv2\_M51D. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято D, как в hu9F5VLv2\_L27cD. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято G, как в hu9F5VLv2\_L27cG. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято S, как в hu9F5VLv2\_L27cS. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято E, как в hu9F5VLv2\_L27cE. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L30 в области VL занято E, как в hu9F5VLv2\_I30E. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L30 в области VL занято K, как в hu9F5VLv2\_I30K. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято T, как в hu9F5VLv2\_L27cT. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято N, как в hu9F5VLv2\_L27cN).

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27b в области VL занято D, как в hu9F5VLv2\_L27bD. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L30 в области VL занято G, как в hu9F5VLv2\_I30G. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L33 в области VL занято N, как в hu9F5VLv2\_L33N. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято A, как в hu9F5VLv2\_L27cA. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L33 в области VL занято T, как в hu9F5VLv2\_L33T. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L33 в области VL занято S, как в hu9F5VLv2\_L33S. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L33 в области VL занято R, как в hu9F5VLv2\_L33R. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L30 в области VL занято Q, как в hu9F5VLv2\_I30Q. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27b в области VL занято T, как в hu9F5VLv2\_L27bT. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L31 в области VL занято G, как в hu9F5VLv2\_T31G.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27b в области VL занято Q, как в hu9F5VLv2\_L27bQ. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L33 в области VL занято G, как в hu9F5VLv2\_L33G. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L27c в области VL занято P, как в hu9F5VLv2\_L27cP. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L78 в области VL занято R, как в hu9F5VLv2\_V78R. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L75 в области VL занято D, как в hu9F5VLv2\_I75D. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L78 в области VL занято D, как в hu9F5VLv2\_V78D. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L78 в области VL занято E, как в hu9F5VLv2\_V78E. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L78 в области VL занято P, как в hu9F5VLv2\_V78P. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L78 в области VL занято K, как в hu9F5VLv2\_V78K. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L77 в области VL занято D, как в hu9F5VLv2\_R77D.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L78 в области VL занято G, как в hu9F5VLv2\_V78G. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение L76 в области VL занято P,





hu9F5VHv4\_L80G. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H82 занято K, как в hu9F5VHv4\_L82K. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H82 занято R, как в hu9F5VHv4\_L82R. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H82 занято E, как в hu9F5VHv4\_L82E. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H82 занято N, как в hu9F5VHv4\_L82N.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H79 занято D, как в hu9F5VHv4\_Y79D. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H79 занято N, как в hu9F5VHv4\_Y79N. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H79 занято G, как в hu9F5VHv4\_Y79G. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H80 занято E, как в hu9F5VHv5\_M80E. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H80 занято G, как в hu9F5VHv5\_M80G. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H82c занято S, как в hu9F5VHv4\_L82cS. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H79 занято Q, как в hu9F5VHv4\_Y79Q. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 положение H82a занято G, как в hu9F5VHv4\_S82aG.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область тяжелой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 вариабельная область легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 каждая из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с последовательностью зародышевой линии человека. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 три CDR тяжелой цепи соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 9 и 10), а три CDR легкой цепи соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, 13 и 14); при условии, что положение H28 занято N или T, положение H51 занято I или V, положение H54 занято N или D, положение H56 занято D или E, положение L27b занято L, D, T или Q, положение L27c занято L, D, G, S, E, T, N, A, P или I, положение L30 занято I, Y, E, K, G или Q, положение L31 занято T, N или G, положение L33 занято L, N, T, S, R или G, положение L51 занято M, G, E, D, K или I, положение L54 занято L, R, G или T, положение L89 занято A или G, положение L92 занято L, D, E, G, Q, T или I, и положение L93 занято E или G.

В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 50. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-H2 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-L1 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-L2 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 55. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-L1 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 172-193. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-L2 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 194-205. В некоторых гуманизированных антителах 9F5 CDR-L3 по Kabat имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 206-213.

Примеры гуманизированных антител включают гуманизированные формы мышинового 10C12, обозначенного Hu10C12.

Мышиное антитело 10C12 включает зрелые вариабельные области тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11, соответственно. В изобретении предложены 2 примера гуманизированных зрелых вариабельных областей тяжелой цепи: hu10C12VHv1 и hu10C12VHv2. В изобретении дополнительно предложены 2 примера зрелых вариабельных областей легкой цепи hu10C12VLv1 и hu10C12VLv2. На фиг. 7 и 8 показано выравнивание вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, соответственно, мышинового 10C12 и различных гуманизированных антител.

По таким причинам, как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, место для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, необычный остаток для своего положения в последовательности вариабельной области человека и вследствие этого потенциальной иммуногенности, снижение потенциала агрегации и по другим причинам следующие 9 положений каркаса вариабельной области были рассмотрены в качестве кандидатов для замены в 2 примерах зрелых вариабельных областей легкой цепи человека и 2 примерах зрелых вариабельных областей тяжелой цепи человека, как далее указано в примерах: L64 (G64S), L104 (V104L), H1 (Q1E), H24 (V24A), H48 (M48I), H67 (V67A), H69 (I69M), H93 (A93T) и H94 (R94T).

Здесь, как и в других местах, первый упомянутый остаток является остатком гуманизированного антитела, образованного путем прививки CDR по Kabat или CDR согласно композитному определению по Chothia-Kabat в случае CDR-H1 акцепторному каркасу человека, а второй упомянутый остаток является остатком, рассматриваемым для замены такого остатка. Таким образом, в пределах каркасов вариабельной области первым упомянутым остатком является человеческий, а в пределах CDR первым упо-

мянутым остатком является мышинный.

Примеры антител включают любые перестановки или комбинации приведенных в качестве примера зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей hu10C12VHv1/ hu10C12VLv1, hu10C12VHv1/ hu10C12VLv2, hu10C12VHv2/ hu10C12VLv1, hu10C12VHv2/ hu10C12VLv2.

Примеры антител включают любые перестановки или комбинации приведенных в качестве примера зрелых переменных областей тяжелой цепи hu10C12VHv1 (SEQ ID NO: 214) и hu10C12VHv2 (SEQ ID NO: 215) с любой из приведенных в качестве примера зрелых переменных областей легкой цепи hu10C12VLv1 (SEQ ID NO: 216) и hu10C12VLv2 (SEQ ID NO: 217).

В изобретении предложены варианты гуманизованного антитела 10C12, в которых гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu10C12VHv1 (SEQ ID NO: 214) или hu10C12VHv2 (SEQ ID NO: 215), а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu10C12VLv1 (SEQ ID NO: 216) или hu10C12VLv2 (SEQ ID NO: 217). В некоторых таких антителах по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или все 9 обратных мутаций или других мутаций в SEQ ID NO: 214-215 и SEQ ID NO: 216-217) сохранены.

В некоторых гуманизованных антителах 10C12 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H24 занято A, H48 занято I, H67 занято A, H69 занято M, H93 занято T, а H94 занято T. В некоторых гуманизованных антителах 10C12 положения H24, H48, H67, H69, H93 и H94 заняты A, I, A, M, T и T соответственно.

В некоторых гуманизованных антителах 10C12 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H1 занято Q или E, H24 занято A, H48 занято I, H67 занято A, H69 занято M, H93 занято T, H94 занято T.

В некоторых гуманизованных антителах 10C12 положения H24, H48, H67, H69, H93 и H94 заняты A, I, A, M, T и T, соответственно, как в hu10C12VHv1. В некоторых гуманизованных антителах 10C12 положения H1, H24, H48, H67, H69, H93 и H94 заняты E, A, I, A, M, T и T соответственно, как в hu10C12VHv2.

В некоторых гуманизованных антителах 10C12 положение L64 в области VL занято S.

В некоторых гуманизованных антителах 10C12 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L64 занято S, L104 занято V или L.

В некоторых гуманизованных антителах 10C12 положения L64 и L104 в области VL заняты S, как в hu10C12VLv1. В некоторых гуманизованных антителах 10C12 положения L64 и L104 в области VL заняты S и L, соответственно, как в hu10C12VLv2.

В некоторых гуманизованных антителах 10C12 переменная область тяжелой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизованных антителах 10C12 переменная область легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизованных антителах 10C12 каждая из переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с последовательностью зародышевой линии человека. В некоторых гуманизованных антителах 10C12 три CDR тяжелой цепи соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 9 и 10), а три CDR легкой цепи соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, 13 и 14).

Примеры гуманизованных антител включают гуманизованные формы мышинного 12C4, обозначенного Hu12C4.

Мышиное антитело 12C4 включает зрелые переменные области тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 11, соответственно. В изобретении предложены 2 примера гуманизованных зрелых переменных областей тяжелой цепи: hu12C4VHv1 и hu12C4VHv2. В изобретении дополнительно предложены 2 примера зрелых переменных областей легкой цепи hu12C4VLv1 и hu12C4VLv2. На фиг. 9 и 10 показано выравнивание переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, соответственно, мышинного 12C4 и различных гуманизованных антител.

По таким причинам, как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, место для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, необычный остаток для своего положения в последовательности переменной области человека и вследствие этого потенциальной иммуногенности, получение потенциала агрегации и по другим причинам следующие 6 положений каркаса переменной области были рассмотрены в качестве кандидатов для замены в 2 примерах зрелых переменных областей легкой цепи человека и 2 примерах зрелых переменных областей тяжелой цепи человека, как далее указано в примерах: L64 (G64S), L104 (V104L), H1 (Q1E), H48 (M48I), H93 (A93T) и H94 (R94T).

Здесь, как и в других местах первый упомянутый остаток является остатком гуманизованного антитела, образованного путем прививки CDR по Kabat или CDR согласно композитному определению по Chothia-Kabat в случае CDR-H1 акцепторному каркасу человека, а второй упомянутый остаток является

остатком, рассматриваемым для замены такого остатка. Таким образом, в пределах каркасов вариabельной области первым упомянутым остатком является человеческий, а в пределах CDR первым упомянутым остатком является мышинный.

Примеры антител включают любые перестановки или комбинации приведенных в качестве примера зрелых вариabельных областях тяжелой и легкой цепей hu12C4VHv1/ hu12C4VLv1, hu12C4VHv1/ hu12C4VLv2, hu12C4VHv2/ hu12C4VLv1, hu12C4VHv2/ hu12C4VLv2.

Примеры антител включают любые перестановки или комбинации приведенных в качестве примера зрелых вариabельных областей тяжелой цепи hu12C4VHv1 (SEQ ID NO: 221) и hu12C4VHv2 (SEQ ID NO: 222) с любой из приведенных в качестве примера зрелых вариabельных областей легкой цепи hu12C4VLv1 (SEQ ID NO: 223) и hu12C4VLv2 (SEQ ID NO: 224).

В изобретении предложены варианты гуманизованного антитела 12C4, в которых гуманизованная зрелая вариabельная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu12C4VHv1 (SEQ ID NO: 221) или hu12C4VHv2 (SEQ ID NO: 222), а гуманизованная зрелая вариabельная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с hu12C4VLv1 (SEQ ID NO: 223) или hu12C4VLv2 (SEQ ID NO: 224). В некоторых таких антителах по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, или все 6 обратных мутаций или других мутаций в SEQ ID NO: 221-222 и SEQ ID NO: 223-224) сохранены.

В некоторых гуманизованных антителах 12C4 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H1 занято Q или E, H48 занято M или I, H93 занято A или T, H94 занято R или T.

В некоторых гуманизованных антителах 12C4 положения H1, H48, H93 и H94 в области VH заняты E, I, T и T, соответственно, как в hu12C4VHv2.

В некоторых гуманизованных антителах 12C4 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L64 занято G или S, L104 занято V или L.

В некоторых гуманизованных антителах 12C4 положения L64 и L104 в области VL заняты S и L, соответственно, как в hu12C4VLv2.

В некоторых гуманизованных антителах 12C4 вариabельная область тяжелой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизованных антителах 12C4 вариabельная область легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизованных антителах 12C4 каждая из вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с последовательностью зародышевой линии человека. В некоторых гуманизованных антителах 12C4 три CDR тяжелой цепи соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 220 и 10), а три CDR легкой цепи соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, 13 и 14).

Примерами гуманизованных антител являются гуманизованные формы мышинового 17C12, обозначенного Hu17C12.

Мышиное антитело 17C12 включает зрелые вариabельные области тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 225 и SEQ ID NO: 228 соответственно. В изобретении предложены 2 примера гуманизованных зрелых вариabельных областей тяжелой цепи: hu17C12VHv1 и hu17C12VHv2. В изобретении дополнительно предложены 2 примера зрелых вариabельных областей легкой цепи hu17C12VLv1 и hu17C12VLv2. На фиг. 11 и 12 показано выравнивание вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи, соответственно, мышинового 17C12 и различных гуманизованных антител.

По таким причинам, как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, место для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, необычный остаток для своего положения в последовательности вариabельной области человека и вследствие этого потенциальной иммуногенности, получение потенциала агрегации и по другим причинам следующие 13 положений каркаса вариabельной области были рассмотрены в качестве кандидатов для замены в 2 примерах зрелых вариabельных областей легкой цепи человека и 2 примерах зрелых вариabельных областей тяжелой цепи человека, как далее указано в примерах: L2 (I2V), L36 (Y36L), L43 (P43S), H1 (Q1E), H2 (V2I), H24 (V24A), H48 (M48I), H67 (V67A), H69 (I69M), H93 (A93T), H94 (R94T), H108 (T108L) и H113 (R113S).

Здесь, как и в других местах, первый упомянутый остаток является остатком гуманизованного антитела, образованного путем прививки CDR по Kabat или CDR согласно композитному определению по Chothia-Kabat в случае CDR-H1 акцепторному каркасу человека, а второй упомянутый остаток является остатком, рассматриваемым для замены такого остатка. Таким образом, в пределах каркасов вариabельной области первым упомянутым остатком является человеческий, а в пределах CDR первым упомянутым остатком является мышинный.

Примеры антител включают любые перестановки или комбинации приведенных в качестве примера зрелых вариabельных областей тяжелой и легкой цепей hu17C12VHv1/hu17C12VLv1, hu17C12VHv1/hu17C12VLv2, hu17C12VHv2/hu17C12VLv1, hu17C12VHv2/hu17C12VLv2.

Примеры антител включают любые перестановки или комбинации приведенных в качестве примера зрелых вариабельных областей тяжелой цепи hu17C12VHv1 (SEQ ID NO: 232) и hu17C12VHv2 (SEQ ID NO: 233) с любой из приведенных в качестве примера зрелых вариабельных областей легкой цепи hu17C12VLv1 (SEQ ID NO: 234) и hu17C12VLv2 (SEQ ID NO: 235).

В изобретении предложены варианты гуманизованного антитела 17C12, в которых гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu17C12VHv1 (SEQ ID NO: 232) или hu17C12VHv2 (SEQ ID NO: 233), а гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с hu17C12VLv1 (SEQ ID NO: 234) или hu17C12VLv2 (SEQ ID NO: 235). В некоторых таких антителах по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или все 13 обратных мутаций или других мутаций в SEQ ID NO: 232-233 и SEQ ID NO: 234-235 сохранены.

В некоторых гуманизованных антителах 17C12 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H2 занято I, H24 занято A, H48 занято I, H67 занято A, H69 занято M, H93 занято T, а H94 занято T. В некоторых гуманизованных антителах 17C12 положения H2, H24, H48, H67, H69, H93 и H94 заняты E, A, I, A, M, T и T соответственно.

В некоторых гуманизованных антителах 17C12 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H1 занято Q или E, H2 занято I, H24 занято A, H48 занято I, H67 занято A, H69 занято M, H93 занято T, H94 занято T, H108 занято T или L, H113 занято R или S.

В некоторых гуманизованных антителах 17C12 положения H2, H24, H48, H67, H69, H93 и H94 в области VH заняты E, A, I, A, M, T и T, соответственно, как в hu17C12VHv1. В некоторых гуманизованных антителах 17C12 положения H1, H2, H24, H48, H67, H69, H93, H94, H108 и H113 в области VH заняты E, I, A, I, A, M, T, T, L, и S, соответственно, как в hu17C12VHv2.

В некоторых гуманизованных антителах 17C12 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L2 занято V, а L36 занято L. В некоторых гуманизованных антителах 17C12 положения L2 и L36 заняты V и L соответственно.

В некоторых гуманизованных антителах 17C12 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L2 занято V, L36 занято L, L43 занято P или S.

В некоторых гуманизованных антителах 17C12 положения L2 и L36 в области VL заняты V и L, соответственно, как в hu17C12VLv1. В некоторых гуманизованных антителах 17C12 положения L2, L36 и L43 в области VL заняты V, L и S, соответственно, как в hu17C12VLv2.

В некоторых гуманизованных антителах 17C12 вариабельная область тяжелой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизованных антителах 17C12 вариабельная область легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизованных антителах 17C12 каждая из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с последовательностью зародышевой линии человека. В некоторых гуманизованных антителах 9F5 три CDR тяжелой цепи соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 226, 227 и 10), а три CDR легкой цепи соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 229-231).

Примерами гуманизованных антител являются гуманизованные формы мышинового 14H3, обозначенного Hu14H3.

Мышиное антитело 14H3 включает зрелые вариабельные области тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240 и SEQ ID NO: 244 соответственно. В изобретении предложены 2 примера гуманизованных зрелых вариабельных областей тяжелой цепи: hu14H3VHv1 и hu14H3VHv2. В изобретении дополнительно предложены 2 примера зрелых вариабельных областей легкой цепи hu14H3VLv1 и hu14H3VLv2. На фиг. 13 и 14 показано выравнивание вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, соответственно, мышинового 14H3 и различных гуманизованных антител.

По таким причинам, как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, место для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, необычный остаток для своего положения в последовательности вариабельной области человека и вследствие этого потенциальной иммуногенности, получение потенциала агрегации и по другим причинам следующие 8 положений каркаса вариабельной области были рассмотрены в качестве кандидатов для замены в 2 примерах зрелых вариабельных областей легкой цепи человека и 2 примерах зрелых вариабельных областей тяжелой цепи человека, как далее указано в примерах: L2 (I2V), L7 (T7S), L37 (L37Q), L87 (Y87F), L100 (G100Q), L104 (V104L), H108 (M108L) и H113 (L113S). Следующее положение CDR вариабельной области было рассмотрено в качестве кандидата на замену в 2 примерах зрелых вариабельных областей тяжелой цепи человека, как далее указано в примерах: H35B (G35BS). В некоторых гуманизованных антителах 14H3 CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 275.

Здесь, как и в других местах, первый упомянутый остаток является остатком гуманизованного антитела, образованного путем прививки CDR по Kabat или CDR согласно композитному определению по Chothia-Kabat в случае CDR-H1 акцепторному каркасу человека, а второй упомянутый остаток является остатком, рассматриваемым для замены такого остатка. Таким образом, в пределах каркасов вариационной области первым упомянутым остатком является человеческий, а в пределах CDR первым упомянутым остатком является мышинный.

Примеры антител включают любые перестановки или комбинации приведенных в качестве примера зрелых вариационных областей тяжелой и легкой цепей hu14H3VHv1/hu14H3VLv1, hu14H3VHv1/hu14H3VLv2, hu14H3VHv2/hu14H3VLv1, hu14H3VHv2/hu14H3VLv2.

Примеры антител включают любые перестановки или комбинации приведенных в качестве примера зрелых вариационных областей тяжелой цепи hu14H3VHv1 (SEQ ID NO: 248) и hu14H3VHv2 (SEQ ID NO: 249) с любой из приведенных в качестве примера зрелых вариационных областей легкой цепи hu14H3VLv1 (SEQ ID NO: 250) и hu14H3VLv2 (SEQ ID NO: 251).

В изобретении предложены варианты гуманизованного антитела 14H3, в которых гуманизованная зрелая вариационная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu14H3VHv1 (SEQ ID NO: 249) или hu14H3VHv2 (SEQ ID NO: 250), а гуманизованная зрелая вариационная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с hu14H3VLv1 (SEQ ID NO: 251) или hu14H3VLv2 (SEQ ID NO: 252). В некоторых таких антителах по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или все 9 обратных мутаций или других мутаций в SEQ ID NO: 249-250 и SEQ ID NO: 251-252 сохранены.

В некоторых гуманизованных антителах 14H3 положение H35B в области VH занято S.

В некоторых гуманизованных антителах 14H3 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято указанной аминокислотой: H35B занято S, H108 занято M или L, H113 занято L или S.

В некоторых гуманизованных антителах 14H3 положение H35B в области VH занято S, как в hu14H3VHv1. В некоторых гуманизованных антителах 14H3 положения H35B, H108 и H113 в области VH заняты S, L и S, соответственно, как в hu14H3VHv2.

В некоторых гуманизованных антителах 14H3 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L2 занято V, а L87 занято F. В некоторых гуманизованных антителах 14H3 положения L2 и L87 заняты V и F соответственно.

В некоторых гуманизованных антителах 14H3 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято указанной аминокислотой: L2 занято V, L7 занято T или S, L37 занято L или Q, L87 занято F, L100 занято G или Q, L104 занято V или L.

В некоторых гуманизованных антителах 14H3 положения L2 и L87 в области VL заняты V и F, соответственно, как в hu14H3VLv1. В некоторых гуманизованных антителах 14H3 положения L2, L7, L37, L87, L100 и L104 в области VL заняты V, S, Q, F, Q и L, соответственно, как в hu14H3VLv2.

В некоторых гуманизованных антителах 14H3 вариационная область тяжелой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизованных антителах 14H3 вариационная область легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизованных антителах 14H3 каждая из вариационной области тяжелой цепи и вариационной области легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с последовательностью зародышевой линии человека. В некоторых гуманизованных антителах 14H3 три CDR тяжелой цепи соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 241-243); при условии, что положение H35B занято G или S, а три CDR легкой цепи соответствуют композитному определению по Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 245-247).

В некоторых гуманизованных антителах 14H3 CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 275.

Области CDR таких гуманизованных антител 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 и 14H3 могут быть идентичными или по существу идентичными областям CDR антител 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3. Области CDR могут быть определены согласно любому традиционному определению (например, по Chothia, или композитному определению по Chothia и Kabat), но предпочтительно они соответствуют определению по Kabat.

Положения каркасов вариационных областей соответствуют нумерации по Kabat, если не указано иное. Другие такие варианты обычно отличаются от последовательностей примеров тяжелых и легких цепей Hu9F5, Hu10C12, Hu12C4, Hu17C12 или Hu14H3 небольшим количеством (например, обычно не более 1, 2, 3, 5, 10 или 15) замен, делеций или вставок. Такие различия обычно возникают в каркасе, но могут также возникать в CDR.

Возможность дополнительных вариаций в гуманизованных вариантах 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 и 14H3 представляют собой дополнительные обратные мутации в каркасах вариационной области. Многие из каркасных остатков, не контактирующих с CDR в гуманизованном mAb, могут вмещать замены аминокислот из соответствующих положений донорских мышинных mAb или других мышинных или человеческих антител, и даже многие потенциальные остатки, контактирующие с CDR, также под-

даются замене. Даже аминокислоты в CDR могут быть изменены, например, остатки, найденные в соответствующем положении акцепторной последовательности человека, используются для снабжения каркасов переменных областей. Кроме того, могут быть использованы альтернативные акцепторные последовательности человека, например, для тяжелой и/или легкой цепи. При использовании различных акцепторных последовательностей одну или более обратных мутаций, рекомендованных выше, можно не проводить, так как соответствующие донорские и акцепторные остатки уже являются одинаковыми и без обратных мутаций.

Предпочтительно замены или обратные мутации в гуманизованных вариантах 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 и 14H3 (консервативные или нет) не оказывают существенного влияния на аффинность связывания или мощность гуманизованного mAb, то есть на его способность связываться с тау.

Гуманизованные антитела 9F5 дополнительно характеризуются способностью связывать фосфорилированный и нефосфорилированный тау, а также неправильно свернутые/агрегированные формы тау.

D. Химерные и венерованные антитела

В изобретении также предложены химерные и венерованные формы нечеловеческих антител, в частности антитела 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3 из примеров.

Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые переменные области легких и тяжелых цепей нечеловеческого антитела (например, мыши) объединены с константными областями легких и тяжелых цепей человека. Такие антитела по существу или полностью сохраняют специфичность связывания мышинового антитела и примерно на две трети состоят из человеческой последовательности.

Венерованное антитело представляет собой тип гуманизованного антитела, которое сохраняет некоторые, а обычно все CDR и некоторые нечеловеческие остатки каркаса переменной области нечеловеческого антитела заменяют другие остатки каркаса переменной области, которые могут вносить вклад в эпитопы В- или Т-клеток, например, доступные остатки (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991) заменять остатками из соответствующих положений последовательности человеческого антитела. В результате получено антитело, в котором CDR полностью или по существу принадлежат нечеловеческому антителу, а каркасы переменной области нечеловеческого антитела становятся более подобными человеческим благодаря заменам. В изобретение включены венерованные формы антител 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 и 14H3.

E. Человеческие антитела

Человеческие антитела, специфически связывающиеся с тау или его фрагментом (например, пептид, включающий или состоящий из аминокислотной последовательности QIVYKP (SEQ ID NO: 57), EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), EIVYKS (SEQ ID NO: 277) или (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56)), получают с помощью различных методов, описанных ниже. Некоторые человеческие антитела отбирают с помощью экспериментов по конкурентному связыванию, способом фагового дисплея Винтера, описанного выше, или иным способом, чтобы иметь ту же эпитопную специфичность, что и конкретное мышинное антитело, например, одно из мышинных моноклональных антител, описанных в примерах. Человеческие антитела также могут быть проверены на специфичность эпитопа с использованием только фрагмента тау, такого как фрагмент тау, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности QIVYKP (SEQ ID NO: 57), EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), EIVYKS (SEQ ID NO: 277) или (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56) в качестве антигена-мишени, и/или путем скрининга антител в на предмет набора вариантов тау, таких как варианты тау, содержащие различные мутации в аминокислотных остатках 307-312, 391-397 или 391-396 SEQ ID NO: 1.

Способы получения человеческих антител включают способ триомы, описанный Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, патент США № 4634664 и Engleman et al., патент США № 4634666, применение трансгенных мышей, включающих гены иммуноглобулинов человека (см., например, Lonberg et al., WO 93/12227 (1993); US 5877397; US 5874299; US 5814318; US 5789650; US 5770429; US 5661016; US 5633425; US 5625126; US 5569825; US 5545806; Neuberger, Nat. Biotechnol. 14:826 (1996) и Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)) способы фагового дисплея (см., например, Dower et al., WO 91/17271; McCafferty et al., WO 92/01047; US 5877218; US 5871907; US 5858657; US 5837242; US 5733743 и US 5565332); и способы, описанные в WO 2008/081008 (например, иммортализация В-клеток памяти, выделенных от человека, например, с помощью ВЭБ, скрининга на желаемые свойства, клонирования и экспрессия рекомбинантных форм).

F. Выбор константной области

Переменные области тяжелой и легкой цепей химерных, венерованных или гуманизованных антител могут быть связаны по меньшей мере с частью константной области человека. Выбор константной области частично зависит от того, желательны ли антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплемент-зависимая цитотоксичность. Например, человеческие изоформы IgG1 и IgG3 обладают комплемент-зависимой цитотоксичностью, а человеческие изоформы IgG2 и IgG4 - нет. Человеческие IgG1 и IgG3 также индуцируют более сильные опосредованные клетками функции, чем человеческие IgG2 и IgG4. Константные области легкой цепи могут быть лямбда или каппа. Системы нумерации для константных областей включают нумерацию по EU (Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)), нумерацию по Kabat (Kabat, Sequences

of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, уникальную систему нумерации IMGT (Lefranc M.-P. et al., IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains, *Dev. Comp. Immunol.*, 29, 185-203 (2005), и нумерацию экзонов по IMGT (Lefranc, см. выше).

Одна или более аминокислот на амино- или карбокси-конце легкой и/или тяжелой цепи, такие как С-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или быть дериватизированными в части или во всех молекулах. В константных областях могут быть произведены замены для уменьшения или увеличения эффекторной функции, такой как опосредованная комплементом цитотоксичность или АЗКЦ (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 полужизни у людей (см., например, Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004). Примеры замен включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428 (нумерация по EU используется в этом абзаце для константной области) для увеличения периода полужизни антитела. Замена в любом или во всех положениях 234, 235, 236 и/или 237 снижает аффинность к рецепторам Fc $\gamma$ , особенно рецептору Fc $\gamma$ RI (см., например, US 6624821). Замена аланина в положениях 234, 235 и 237 человеческого IgG1 может быть использована для снижения эффекторных функций. Некоторые антитела имеют замену аланином в положениях 234, 235 и 237 человеческого IgG1 для снижения эффекторных функций. Необязательно, положения 234, 236 и/или 237 в человеческом IgG2 заменены аланином, а положение 235 заменено глутамином (см., например, US 5624821). В некоторых антителах используется мутация в одном или более положениях 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331 по нумерации EU человеческого IgG1. В некоторых антителах используется мутация в одном или более положениях, 318, 320 и 322 по нумерации EU человеческого IgG1. В некоторых антителах положения 234 и/или 235 замещены аланином и/или положение 329 замещено глицином. В некоторых антителах положения 234 и 235 замещены аланином. В некоторых антителах изотипом является человеческий IgG2 или IgG4.

Антитела могут экспрессироваться в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv или в виде одноцепочечных антител, в которых переменные домены тяжелой и легкой цепи связаны посредством спейсера.

Человеческие константные области демонстрируют аллотипические вариации и изоаллотипические вариации у разных индивидуумов, то есть константные области могут различаться у разных индивидуумов в одном или более полиморфных положениях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотки, распознающие изоаллотип, связываются с непалиморфной областью одного или более других изотипов. Так, например, другая константная область тяжелой цепи представляет собой G1m3 IgG1 с С-концевым лизином или без него. Ссылка на константную область человека включает константную область с любым природным аллотипом или любую перестановку остатков, занимающих положения в природных аллотипах.

#### Г. Экспрессия рекомбинантных антител

Известен ряд способов получения химерных и гуманизированных антител с использованием линии клеток, экспрессирующих антитела (например, гибридомы). Например, переменные области иммуноглобулина антител можно клонировать и секвенировать с использованием хорошо известных способов. В одном способе переменную область VH тяжелой цепи клонируют с помощью ОТ-ПЦР с использованием мРНК, полученной из клеток гибридомы. Консенсусные праймеры используют для лидерного пептида области VH, охватывающего кодон инициации трансляции в качестве 5'-праймера и 3'-праймера, специфичного для константных областей g2b. Примеры праймеров описаны в патентной публикации США US 2005/0009150 Schenk et al. (далее "Schenk"). Последовательности из нескольких независимо полученных клонов можно сравнивать, чтобы гарантировать отсутствие изменений во время амплификации. Последовательность области VH также может быть определена или подтверждена секвенированием фрагмента VH, полученного с помощью методологии ОТ-ПЦР с 5'-RACE (быстрая амплификация концов кДНК) и праймера, специфичного для 3'g2b.

Аналогичным образом можно клонировать переменную область VL легкой цепи. В одном подходе набор консенсусных праймеров сконструирован для амплификации областей VL с использованием 5'-праймера, сконструированного для гибридизации с областью VL, содержащей кодон инициации трансляции, и 3'-праймером, специфичным для области C $\kappa$ , расположенной ниже области соединения V-J. Во втором подходе методология ОТ-ПЦР с 5'-RACE используется для клонирования кДНК, кодирующей VL. Примеры праймеров описаны у Schenk, выше. Затем клонированные последовательности объединяют с последовательностями, кодирующими константные области человека (или других видов, не относящихся к человеку).

В одном подходе переменные области тяжелой и легкой цепей реконструируют для кодирования донорных последовательностей сплайсинга ниже соответствующих соединений VDJ или VJ и клонируют в вектор экспрессии млекопитающих, такой как pCMV-hy1 для тяжелой цепи и pCMV-M $\kappa$ 1 для легкой цепи. Эти векторы кодируют константные области  $\gamma$ 1 и C $\kappa$  человека в виде экзонных фрагментов ниже вставленной кассеты переменной области. После проверки последовательности векторы экспрессии

тяжелой цепи и легкой цепи можно котрансфицировать в клетки СНО для получения химерных антител. Кондиционированные среды собирают через 48 ч после трансфекции и анализируют вестерн-блоттингом на предмет продукции антител или проводят твердофазный ИФА на предмет связывания антигена. Химерные антитела гуманизируют, как описано выше.

Химерные, венированные, гуманизированные антитела и антитела человека обычно получают путем рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно включают последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с кодирующими последовательностями цепей антител, включая естественно связанные или гетерологичные элементы контроля экспрессии, такие как промотор. Последовательности контроля экспрессии могут быть промоторными системами в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические или прокариотические клетки-хозяева. Как только вектор будет включен в соответствующего хозяина, для этого хозяина поддерживают такие условия, которые подходят для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей, а также для сбора и очистки перекрестно реагирующих антител.

Данные векторы экспрессии, как правило, являются воспроизводимыми в организме-хозяине в виде эписом или в качестве составляющей части хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессирующие векторы содержат маркеры селекции, например, устойчивости к ампициллину или устойчивости к гигромицину, чтобы обеспечить обнаружение этих клеток, трансформированных желаемыми последовательностями ДНК.

*E. coli* является прокариотическим хозяином, применимым для экспрессии антител, особенно фрагментов антител. Для экспрессии можно также использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. *Saccharomyces* представляет собой дрожжевой хозяин с подходящими векторами, имеющими последовательности контроля экспрессии, точку начала репликации, последовательности терминации и тому подобное, если желательно. К типичным промоторам относится 3-фосфоглицераткиназа и другие гликолитические ферменты. К индуцируемым дрожжевым промоторам относятся, среди прочих, промоторы из алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома С и ферментов, которые отвечают за использование мальтозы и галактозы.

Клетки млекопитающих можно использовать для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Был разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и они включают линии клеток СНО, различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки НЕК293, L-клетки и клетки миеломы, не продуцирующие антитела, включая Sp2/0 и NS0. Клетки могут быть нечеловеческими. Векторы экспрессии этих клеток могут включать в себя последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), и необходимые информационные сайты процессинга, такие как сайты связывания рибосомы, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Последовательности контроля экспрессии могут включать промоторы, происходящие от эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, вируса папилломы крупного рогатого скота и т.п. См. Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Альтернативно, кодирующие последовательности антител могут быть включены в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоке трансгенного животного (см., например, патент США № 5741957; патент США № 5304489 и патент США № 5849992). Подходящие трансгены включают кодирующие последовательности для легких и/или тяжелых цепей, функционально связанных с промотором и энхансером из гена, специфичного для молочной железы, такого как казеин или бета-лактоглобулин.

Векторы, содержащие представляющие интерес сегменты ДНК, могут быть перенесены в клетку-хозяин способами, зависящими от типа клетки-хозяина. Например, трансфекция хлоридом кальция обычно используется для прокариотических клеток, тогда как обработка фосфатом кальция, электропорация, липофекция, биолистика или трансфекция на основе вирусов могут использоваться для других клеток-хозяев. Другие способы, используемые для трансформации клеток млекопитающих, включают использование полибрена, слияния протопластов, липосомы, электропорацию и микроинъекцию. Для получения трансгенных животных трансгены можно микроинъектировать в оплодотворенные ооциты или они могут быть включены в геном эмбриональных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), а ядра таких клеток переносятся в энуклеированные ооциты.

После введения вектора(ов), кодирующего(их) тяжелую и легкую цепи антитела, в культуру клеток, пулы клеток могут быть проверены на продуктивность роста и качество продукта в бессывороточной среде. Пулы высокопродуктивных клеток затем могут быть подвергнуты клонированию отдельных клеток на основе FACS для создания моноклональных линий. Можно использовать удельную продуктивность выше 50 или 100 пг на клетку в день, что соответствует титрам продукта выше 7,5 г/л культуры. Антитела, полученные из клонов отдельных клеток, могут быть также протестированы на мутность, фильтрационные свойства, посредством ПААГ, ИЭФ, УФ-сканирования, ВЭЭХ, картирования углевод-олигосахаридов, масс-спектрометрии и анализа связывания, например, твердофазного ИФА или *Viacore*. Выбранный клон затем можно поместить в банк в нескольких флаконах и хранить в заморожен-

ном виде для последующего применения.

После экспрессии антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами в данной области, включая захват протеина А, очистку ВЭЖХ, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п. (см. в целом, *Scopes, Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Может быть использована методология коммерческого производства антител, включая оптимизацию кодонов, выбор промоторов, выбор элементов транскрипции, выбор терминаторов, бессывороточное клонирование одноклеточных, банкинг клеток, использование маркеров селекции для усиления числа копий, терминатора СНО или улучшения титра белка (см., например, US 5786464; US 6114148; US 6063598; US 7569339; WO 2004/050884; WO 2008/012142; WO 2008/012142; WO 2005/019442; WO 2008/107388; WO 009/027471 и US 5888809).

#### IV. Активные иммуногены

Средство, используемое для активной иммунизации, служит для индукции у пациента тех же типов антител, которые описаны выше в связи с пассивной иммунизацией. Средствами, используемыми для активной иммунизации, могут быть те же типы иммуногенов, которые используются для генерации моноклональных антител у лабораторных животных, например, пептид из 3-15, или 3-12, или 5-12, или 5-8 смежных аминокислот из области тау, соответствующие остаткам 307-312 или 391-397 или 391-396 SEQ ID NO: 1, такие как, например, тау-пептид, включающий или состоящий из остатков 307-312, 391-397 или 391-396 SEQ ID NO: 1) или тау-пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности QIVYKP (SEQ ID NO: 57), тау-пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), тау-пептид, содержащий или состоящий из кислотная последовательность EIVYKS (SEQ ID NO: 277) или тау-пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56). Для индукции связывания антител с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3, эпитопная специфичность этих антител может быть картирована (например, путем тестирования связывания с серией перекрывающихся пептидов, охватывающих тау). Затем в качестве иммуногена можно использовать фрагмент тау, состоящий из эпитопа, включающий или перекрывающий его. Такие фрагменты обычно используются в нефосфорилированной форме.

Гетерологичный носитель и адъювант, если они используются, могут быть такими же, как используемые для получения моноклональных антител, но также могут быть выбраны для лучшей фармацевтической пригодности для использования у людей. Подходящие носители включают сывороточные альбумины, гемоглобин лимфы улитки, молекулы иммуноглобулина, тиреоглобулин, яичный альбумин, столбнячный анатоксин или анатоксин других патогенных бактерий, таких как дифтерия (например, CRM197), *E. coli*, холера или *H. pylori*, или производное аттенуированного токсина. Эпитопы Т-клеток также являются подходящими молекулами-носителями. Некоторые конъюгаты могут быть образованы путем связывания средств по изобретению с иммуностимулирующей полимерной молекулой (например, трипальмитоил-S-глицерин цистеином (Pam<sub>3</sub>Cys), маннаном (полимер маннозы) или глюканом (полимер β 1→2)), цитокинами (например, IL-1, IL-1 альфа и β пептиды, IL-2, γ-INF, IL-10, ГМ-КСФ) и хемокинами (например, MIP1-α и β и RANTES). Иммуногены могут быть связаны с носителями с помощью аминокислот-спейсеров или без них (например, gly-gly). Дополнительные носители включают вирусоподобные частицы. Вирусоподобные частицы (VLP), также называемые псевдовирионами или вирусными частицами, представляют собой субъединичные структуры, состоящие из множества копий вирусного капсида и/или белка оболочки, способных к самосборке в VLP с определенной сферической симметрией *in vivo*. (Powelleit, et al., (2007) PLoS ONE 2(5):e415.) Альтернативно, пептидные иммуногены могут быть связаны по меньшей мере с одним искусственным Т-клеточным эпитопом, способным связывать большую часть молекул класса II МНС, таких как эпитоп pan DR ("PADRE"). PADRE описан в US 5 736 142, WO 95/07707 и в Alexander J et al, *Immunity*, 1:751-761 (1994). Активные иммуногены могут быть представлены в мультимерной форме, в которой несколько копий иммуногена и/или его носителя представлены в виде одной ковалентной молекулы.

Фрагменты часто вводят с фармацевтически приемлемыми адъювантами. Адъювант увеличивает титр индуцированных антител и/или аффинность связывания индуцированных антител по сравнению с ситуацией, если пептид используется отдельно. Различные адъюванты можно использовать в комбинации с иммуногенным фрагментом тау, чтобы вызвать иммунный ответ. Некоторые адъюванты усиливают внутренний ответ на иммуноген, не вызывая конформационных изменений иммуногена, влияющих на качественную форму ответа. Некоторые адъюванты включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия, 3 De-O-ацилированный монофосфорилилипид А (MPL™) (см. GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, now part of Corixa). Stimulon™ QS-21 представляет собой тритерпеновый гликозид или сапонин, выделенный из коры дерева *Quillaja Saponaria Molina*, произрастающего в Южной Америке (см. 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). Другими адъювантами являются эмульсии масло в воде (например, сквален или арахисовое масло), необязательно в комбинации с иммуностимуляторами, такими

как монофосфориллипид А (см. Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)), плюроновые полимеры и убитые микобактерии. Адьюванты Рибид представляют собой эмульсии типа масло в воде. Рибид содержит метаболизируемое масло (сквален), эмульгированное физиологическим раствором, содержащим Твин 80. Рибид также содержит очищенные микобактериальные продукты, которые действуют как иммуностимуляторы, и бактериальный монофосфориллипид А. Другой адьювант представляет собой CpG (WO 98/40100). Адьюванты можно вводить в качестве компонента терапевтической композиции с активным средством или их можно вводить отдельно, до, одновременно или после введения терапевтического средства.

Также можно использовать аналоги природных фрагментов тау, которые индуцируют антитела к тау. Например, одна или более, или все L-аминокислоты могут быть заменены D-аминокислотами в таких пептидах. Также порядок аминокислот может быть обратным (ретропептид). Необязательно пептид включает все D-аминокислоты в обратном порядке (ретроинверсный пептид). Пептиды и другие соединения, которые не обязательно имеют значительное сходство аминокислотной последовательности с тау-пептидами, но тем не менее служат имитаторами тау-пептидов и вызывают аналогичный иммунный ответ. Также можно использовать антиидиотипические антитела против моноклональных антител к тау, как описано выше. Такие анти-Id-антитела имитируют антиген и вызывают иммунный ответ на него (см. Essential Immunology, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., p. 181).

Пептиды (и необязательно носитель, слитый с пептидом) также можно вводить в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид и экспрессируемой *in situ* у пациента. Сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий иммуноген, обычно связан с регуляторными элементами, такими как промотор и энхансер, которые обеспечивают экспрессию сегмента ДНК в намеченных клетках-мишенях пациента. Для экспрессии в клетках крови, что желательно для индукции иммунного ответа, элементы промотора и энхансера из генов иммуноглобулинов легкой или тяжелой цепи или главного промежуточного раннего промотора и энхансера CMV подходят для направления экспрессии. Связанные регуляторные элементы и кодирующие последовательности часто клонируют в вектор. Антитела также можно вводить в форме нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую и/или легкую цепи антитела. Если присутствуют как тяжелая, так и легкая цепи, тогда цепи предпочтительно связаны как одноцепочечное антитело. Антитела для пассивного введения также можно получить, например, с помощью аффинной хроматографии из сыворотки пациентов, получавших пептидные иммуногены.

ДНК может быть доставлена в незащищенной форме (т.е. без коллоидных или инкапсулирующих материалов). В качестве альтернативы можно использовать ряд вирусных векторных систем, включая ретровирусные системы (см., например, Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)), включая векторы, полученные из ретровируса, такие как MMLV, ВИЧ-1 и ALV; аденовирусные векторы (см., например, Bett et al. J. Virol. 67, 5911 (1993)); аденоассоциированные вирусные векторы (см., например, Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)), лентивирусные векторы, такие как векторы на основе gag-последовательностей ВИЧ или FIV, вирусные векторы из семейства оспы, включая вирус осповакцины и вирус оспы птиц, вирусные векторы из рода альфа-вирусов, такие как векторы, полученные из вируса Синдбис и вируса леса Семлики (см., например, Dubensky et al., J. Virol. 70, 508-519 (1996)), вируса венесуэльского конского энцефалита (см. US 5643576) и рабдовирусов, таких как вирус везикулярного стоматита (см. WO 96/34625) и папилломавирусов (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)).

ДНК, кодирующая иммуноген или кодирующая тяжелую и/или легкую цепи антитела, или вектор, содержащий их, может быть упакована в липосомы. Подходящие липиды и родственные аналоги описаны в US 5208036, US 5264618, US 5279833 и US 5283185. Векторы и ДНК, кодирующие иммуноген или кодирующие тяжелые и/или легкие цепи антитела, также могут быть адсорбированы или связаны с носителями в виде частиц, примеры которых включают полиметилметакрилатные полимеры и полилактиды и поли(лактид-согликолиды) (см., например, McGee et al., J. Micro Encap. 1996).

Векторы или их сегменты, кодирующие тяжелую и/или легкую цепи антитела, могут быть включены в клетки *ex vivo*, например, в клетки, эксплантированные от отдельного пациента (например, лимфоциты, аспираты костного мозга, биопсия ткани) или универсальные донорские гематопозитические стволовые клетки с последующей повторной имплантацией клеток пациенту, обычно после отбора клеток, в которые включены трансгены. (см., например, WO 2017/091512). Примеры клеток, полученных от пациента, включают полученные от пациента индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) или другие типы стволовых клеток (эмбриональные, гематопозитические, нервные или мезенхимальные).

Вектор или его сегмент, кодирующий тяжелую и/или легкую цепи антитела, можно ввести в любую представляющую интерес область в клетках *ex vivo*, такую как ген альбумина или другой ген "безопасного убежища". Клетки, включающие вектор, можно имплантировать с предварительной дифференцировкой или без нее. Клетки можно имплантировать в конкретную ткань, такую как секреторная ткань или место патологии, или системно, например путем инфузии в кровь. Например, клетки можно имплантировать в секреторную ткань пациента, такую как печень, необязательно с предварительной дифференцировкой в клетки, присутствующие в этой ткани, такие как гепатоциты в случае печени. Экспрессия антитела в печени приводит к секреции антитела в кровь.

#### Н. Скрининговые анализы антител

Первоначально антитела можно подвергнуть скринингу на предмет предполагаемой специфичности связывания, как описано выше. Активные иммуногены также могут быть проверены на способность индуцировать антитела с такой специфичностью связывания. В этом случае активный иммуноген используется для иммунизации лабораторного животного, а полученные сыворотки тестируются на соответствующую специфичность связывания.

Затем антитела, обладающие желаемой специфичностью связывания, можно тестировать на клеточных и животных моделях. Клетки, используемые для такого скрининга, предпочтительно представляют собой нейрональные клетки. Сообщалось о клеточной модели патологии тау, в которой клетки нейробластомы трансфицируют доменом с четырьмя повторами тау, необязательно с мутацией, связанной с патологией тау (например, дельта K280, см. 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, появление агрегатов тау после включения экспрессии гена тау, растворение агрегатов тау после повторного выключения экспрессии гена и эффективность антител в ингибировании образования агрегатов тау или их дезагрегации.

Антитела или активные иммуногены также можно подвергать скринингу на трансгенных животных моделях заболеваний, ассоциированных с тау. Такие трансгенные животные могут включать трансген тау (например, любую из изоформ человека) и, необязательно, трансген APP человека среди прочего, например, киназу, фосфорилирующую тау, ApoE, пресенилин или альфа-синуклеин. Такие трансгенные животные склонны к развитию по меньшей мере одного признака или симптома заболевания, ассоциированного с тау.

Примером трансгенного животного является линия мышей K3 (Itner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(41): 15997-6002 (2008)). У этих мышей есть трансген человеческого тау с мутацией K 369 I (мутация связана с болезнью Пика) и промотор Thy 1.2. Данная модель показывает быстрое течение нейродегенерации, двигательного нарушения, дегенерации афферентных волокон и гранулярных клеток мозжечка. Другим примером животных является линия мышей JNPL3. Эти мыши имеют трансген тау человека с мутацией P301L (мутация связана с лобно-височной деменцией) и промотор Thy 1.2 (Taconic, Germantown, N.Y., Lewis, et al., *Nat Genet.* 25:402-405 (2000)). У этих мышей нейродегенерация протекает постепенно. У мышей развиваются нейрофибриллярные клубки в нескольких областях головного мозга и спинного мозга, что полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Это отличная модель для изучения последствий развития клубков и для скринингового лечения, которое может ингибировать образование этих агрегатов. Еще одним преимуществом этих животных является относительно раннее начало патологии. В гомозиготной линии поведенческие аномалии, связанные с патологией тау, могут наблюдаться по меньшей мере уже через 3 месяца, но животные остаются относительно здоровыми по меньшей мере до 8-месячного возраста. Другими словами, в 8 месяцев животные передвигаются, едят и могут достаточно хорошо выполнять поведенческие задачи, чтобы можно было контролировать эффект лечения. Активная иммунизация этих мышей в течение 6-13 месяцев с помощью AI с KLN-PHF-1 дала титры около 1000 и показала меньшее количество нейрофибриллярных клубков, меньше pSer422 и меньшую потерю массы тела по сравнению с необработанными контрольными мышами.

Активность антител или активных средств можно оценить по различным критериям, включая снижение количества общего тау или фосфорилированного тау, снижение других патологических характеристик, таких как отложения амилоида A $\beta$ , а также ингибирование или задержку, или поведенческие нарушения. Активные иммуногены также можно тестировать на индукцию антител в сыворотках. Как пассивные, так и активные иммуногены можно тестировать на прохождение антител через гематоэнцефалический барьер в головной мозг трансгенного животного. Антитела или фрагменты, индуцирующие антитела, также можно тестировать на нечеловеческих приматах, у которых естественным путем или путем индукции развиваются симптомы заболеваний, характеризующихся тау. Тесты антитела или активного средства обычно проводят в сочетании с контролем, в котором проводят параллельный эксперимент, за исключением того, что антитело или активное средство отсутствуют (например, заменены носителем). Снижение, задержка или ингибирование признаков или симптомов заболевания, связанных с тестируемым антителом или активным средством, затем могут быть оценены относительно контроля.

#### V. Пациенты, поддающиеся лечению

Наличие нейрофибриллярных клубков было обнаружено при ряде заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичную возрастную тауопатию, посттравматическую деменцию или деменцию боксеров, болезнь Пика, болезнь Нимана-Пика типа C, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен, глобулярную глиальную тауопатию, боковой амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальную дегенерацию (КБД), деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническую травматическую энцефалопатию (ХТЭ), глобулярную глиальную тауопатию (ГГТ), болезнь Паркинсона или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). Настоящие схе-

мы также можно использовать для лечения или профилактики любого из этих заболеваний. Из-за широко распространенной связи между неврологическими заболеваниями и состояниями, а также тау, настоящие схемы могут использоваться для лечения или профилактики любого субъекта, у которого наблюдаются повышенные уровни тау или фосфорилированного тау (например, в СМЖ) по сравнению со средним значением у индивидуумов без неврологических заболеваний. Настоящие схемы также можно использовать для лечения или профилактики неврологического заболевания у индивидуумов, имеющих мутацию тау, ассоциированную с неврологическим заболеванием. Настоящие способы особенно подходят для лечения или профилактики болезни Альцгеймера, особенно у пациентов.

Пациенты, поддающиеся лечению, включают индивидуумов с риском развития заболевания, но не демонстрирующих симптомы, а также пациентов, у которых в настоящее время проявляются симптомы. К пациентам с риском развития заболевания относятся пациенты с известным генетическим риском развития заболевания. К таким индивидуумам относятся те, у кого есть родственники, перенесшие данное заболевание, и те, риск у которых определяется анализом генетических или биохимических маркеров. Генетические маркеры риска включают мутации тау, такие как те, что обсуждались выше, а также мутации в других генах, ассоциированных с неврологическим заболеванием. Например, аллель ApoE4 в гетерозиготной и тем более гомозиготной форме ассоциируется с риском развития болезни Альцгеймера. Другие маркеры риска развития болезни Альцгеймера включают мутации в гене APP, в частности, мутации в положении 717 и положениях 670 и 671, называемые мутацией Харди и шведской мутацией, соответственно, мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, БА, гиперхолестеринемия или атеросклероз в семейном анамнезе. Индивидуумов, страдающих в настоящее время болезнью Альцгеймера, можно распознать с помощью ПЭТ-визуализации по характерной деменции, а также по наличию факторов риска, описанных выше. Кроме того, доступен ряд диагностических тестов для выявления индивидуумов с БА. Они включают измерение уровней тау или фосфо-тау в СМЖ и A $\beta$ 42. Повышенные уровни тау или фосфо-тау и пониженные уровни A $\beta$ 42 указывают на наличие БА. Некоторые мутации, ассоциированные с болезнью Паркинсона, A1a30Pro или A1a53 или мутации в других генах, ассоциированных с болезнью Паркинсона, таких как киназа с высоким содержанием лейцина, PARK8. Индивидуумам также может быть поставлен диагноз любого из неврологических заболеваний, упомянутых выше, по критериям DSM IV TR (Диагностическое и статистическое руководство по психическим расстройствам, четвертая редакция, пересмотренная).

У бессимптомных пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, 10, 20, 30). Однако обычно нет необходимости начинать лечение до достижения пациентом возраста 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение, как правило, предполагает прием нескольких доз в течение определенного периода времени. За лечением можно осуществлять мониторинг, анализируя уровни антител с течением времени. Если ответ падает, назначается введение бустерной дозы. В случае потенциальных пациентов с синдромом Дауна лечение можно начинать в пренатальный период с введения терапевтического средства матери или вскоре после рождения.

#### I. Нуклеиновые кислоты

В изобретении дополнительно предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любую из тяжелых и легких цепей, описанных выше (например, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15-22, SEQ ID NO: 23-29, 61-108, 109-129, 130-171, 214-217, 219, 221-224, 225, 228, 232-235, 240, 244 и 248-251). Необязательно, такие нуклеиновые кислоты дополнительно кодируют сигнальный пептид и могут быть экспрессированы сигнальным пептидом, связанным с варибельной областью. Кодирующие последовательности нуклеиновых кислот могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, таких как промотор, энхансер, сайт связывания рибосомы, сигнал терминации транскрипции и т.п. Регуляторные последовательности могут включать промотор, например, прокариотический промотор или эукариотический промотор. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые или легкие цепи, могут быть оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетке-хозяине. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут кодировать выбираемый ген. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут находиться в выделенной форме или могут быть клонированы в один или более векторов. Нуклеиновые кислоты можно синтезировать, например, твердофазным синтезом или ПЦП перекрывающихся олигонуклеотидов. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи, могут быть соединены как одна непрерывная нуклеиновая кислота, например, в векторе экспрессии, или могут быть отдельными, например, каждая клонирована в свой собственный вектор экспрессии.

#### J. Конъюгированные антитела

Конъюгированные антитела, которые специфически связываются с антигенами, такими как тау, применимы для выявления наличия тау; мониторинга и оценки эффективности терапевтических средств, используемых для лечения пациентов, у которых диагностированы болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная тауопатия, постэнцефалитный паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Нимана-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, заболевание,

характеризующееся появлением аргирофильных зерен, глобулярная глиальная тауопатия, боковой амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), глобулярная глиальная тауопатия (ГТТ), болезнь Паркинсона или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП); ингибирования или уменьшения агрегации тау; ингибирования или уменьшения образования фибрилл тау; уменьшения или очищения отложений тау; стабилизации нетоксичных конформаций тау; лечения или профилактики болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной тауопатии, постэнцефалитного паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Нимана - Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен, глобулярной глиальной тауопатии, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ), глобулярной глиальной тауопатии (ГТТ), болезни Паркинсона или прогрессирующего надъядерного паралича (ИНН). Например, такие антитела можно конъюгировать с другими терапевтическими соединениями, другими белками, другими антителами и/или детектируемыми метками. См. WO 03/057838; US 8455622. Такие терапевтические соединения могут представлять любое средство, которое может быть использовано для лечения, борьбы, облегчения, предотвращения или улучшения нежелательного состояния или заболевания у пациента, такого как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная тауопатия, постэнцефалитный паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Нимана - Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен, глобулярная глиальная тауопатия, боковой амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), глобулярная глиальная тауопатия (ГТТ), болезнь Паркинсона или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

Конъюгированные терапевтические соединения могут включать цитотоксические средства, цитостатические средства, нейротрофические средства, нейрозащитные средства, радиотерапевтические средства, радиоактивные (радиофармацевтические), флуоресцентные, парамагнитные индикаторы, ультразвуковые контрастные агенты, иммуномодуляторы или любые биологически активные средства, которые способствуют или усиливают активность антитела, или изменяют биодоступность и распределение в организме или внутри органов. Цитотоксическое средство может представлять собой любое средство, токсичное для клетки. Цитостатическое средство может представлять собой любое средство, подавляющее пролиферацию клеток. Нейротрофическое средство может представлять собой любое средство, включая химические или белковые средства, которое способствует поддержанию, росту или дифференцировке нейронов. Нейрозащитное средство может представлять собой любое средство, включая химические или белковые средства, которое защищает нейроны от острого поражения или дегенеративных процессов. Иммуномодулятор может представлять собой любое средство, которое стимулирует или ингибирует развитие или поддержание иммунологического ответа. Радиотерапевтическое средство может представлять собой любую молекулу или соединение, излучающее излучение. Если такие терапевтические фрагменты связаны с тау-специфическим антителом, таким как антитела, описанные в данном документе, связанные терапевтические фрагменты будут иметь специфическую аффинность к клеткам, пораженным тау-ассоциированным заболеванием по сравнению с нормальными клетками. Следовательно, введение конъюгированных антител напрямую нацелено на раковые клетки с минимальным повреждением окружающей нормальной здоровой ткани. Это может быть особенно полезно для терапевтических соединений, которые являются слишком токсичными при введении отдельно. Кроме того, можно использовать меньшие количества терапевтических соединений.

Некоторые такие антитела можно модифицировать, чтобы они действовали как иммунотоксины. См., например, патент США № 5194594. Например, рибин, клеточный токсин, полученный из растений, может быть связан с антителами с использованием бифункциональных реагентов S-ацетилмеркаптоантарного ангидрида для антитела и сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата для рибина. См. Pietersz et al., *Cancer Res.* 48(16):4469-4476 (1998). Связывание приводит к потере активности рибина по связыванию В-цепи, при этом не ухудшается ни токсический потенциал А-цепи рибина, ни активность антитела. Аналогично, сапорин, ингибитор рибосомной сборки, может быть связан с антителами через дисульфидную связь между химически вставленными сульфгидрильными группами. См. Polito et al., *Leukemia* 18:1215-1222 (2004).

Некоторые такие антитела могут быть связаны с радиоизотопами. Примеры радиоизотопов включают, например, иттрий<sup>90</sup> (<sup>90</sup>Y), индий<sup>111</sup> (<sup>111</sup>In), <sup>131</sup>I, <sup>99</sup>mTc, радиоактивное серебро-111, радиоактивное серебро-199 и висмут<sup>213</sup>. Связывание радиоизотопов с антителами может быть осуществлено с помощью обычных бифункциональных хелатов. Для связи радиоактивного серебра-111 и радиоактивного серебра-199 могут использоваться линкеры на основе серы. См. Nazra et al., *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Связыва-

вание радиоизотопов серебра может включать снижение иммуноглобулина аскорбиновой кислотой. Для радиоизотопов, таких как  $^{111}\text{In}$  и  $^{90}\text{Y}$ , можно использовать ибритумомаб тиуксетан, который будет вступать в реакцию с такими изотопами с образованием  $^{111}\text{In}$ -ибритумомаба тиуксетана и  $^{90}\text{Y}$ -ибритумомаба тиуксетана, соответственно. См. Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

Некоторые такие антитела могут быть связаны с другими терапевтическими соединениями. Такие терапевтические соединения могут быть, например, цитотоксическими, цитостатическими, нейротрофическими или нейрозащитными. Например, антитела можно конъюгировать с токсичными химиотерапевтическими лекарственными средствами, такими как майтанзин, гелданамицин, ингибиторами тубулина, такими как средства, связывающие тубулин (например, ауристатины), или средствами, связывающими малые бороздки, такими как калихеамицин. Другие репрезентативные терапевтические соединения включают средства, известные как применяемые для лечения, контроля или облегчения болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной тауопатии, постэнцефалитного паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Нимана - Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен, глобулярной глиальной тауопатии, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ), глобулярной глиальной тауопатии (ГГТ), болезни Паркинсона или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП).

Антитела также могут быть связаны с другими белками. Например, антитела могут быть связаны с финомерами. Финомеры представляют собой небольшие связывающие белки (например, 7 кДа), происходящие из домена Fyn SH3 человека. Они могут быть стабильными и растворимыми, и в них могут отсутствовать остатки цистеина и дисульфидные связи. Финомеры могут быть сконструированы с возможностью связывания с молекулами-мишенями с такой же аффинностью и специфичностью, что и антитела. Они подходят для создания мультиспецифических гибридных белков на основе антител. Например, финомеры могут быть слиты с N-концом и/или C-концом антител для создания би- и триспецифичных FynomAb с различной архитектурой. Финомеры могут быть выбраны с использованием библиотек финомеров с помощью технологий скрининга с использованием FACS, Biacore и клеточных анализов, которые позволяют эффективно выбирать финомеры с оптимальными свойствами. Примеры финомеров раскрыты в публикации Grabulovski et al., *J. Biol. Chem.* 282:3196-3204 (2007); Bertschinger et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 20:57-68 (2007); Schlatter et al., *MAbs.* 4:497-508 (2011); Banner et al., *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(Pt6): 1124-1137 (2013); and Brack et al., *Mol Cancer Ther.* 13:2030-2039 (2014).

Описанные в данном документе антитела также могут быть связаны или конъюгированы с одним или более другими антителами (например, с образованием гетероконъюгатов антител). Такие другие антитела могут связываться с разными эпитопами внутри тау или могут связываться с другим антигеном-мишенью.

Антитела также могут быть связаны с детектируемой меткой. Такие антитела могут быть использованы, например, для диагностики болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной тауопатии, постэнцефалитного паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Нимана-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен, глобулярной глиальной тауопатии, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ), глобулярной глиальной тауопатии (ГГТ), болезни Паркинсона или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), и/или для оценки эффективности лечения. Такие антитела особенно применимы при проведении таких определений у субъектов, страдающих или предрасположенных к развитию таких заболеваний как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная тауопатия, постэнцефалитный паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Нимана-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен, глобулярная глиальная тауопатия, боковой амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), глобулярная глиальная тауопатия (ГГТ), болезнь Паркинсона или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), или в соответствующих биологических образцах, полученных от таких субъектов. Репрезентативные детектируемые метки, которые могут быть слиты или связаны с антителом, включают различные ферменты, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; протестические группы, такие как стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин, флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как люминол;

биолюминесцентные материалы, такие как люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, такие как радиоактивное серебро-111, радиоактивное серебро-199, висмут<sup>213</sup>, йод (<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), углерод (<sup>14</sup>C), сера (<sup>35</sup>S), тритий (<sup>3</sup>H), индий (<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In), технеций (<sup>99</sup>Tc), таллий (<sup>201</sup>Tl), галлий (<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), палладий (<sup>103</sup>Pd), молибден (<sup>99</sup>Mo), ксенон (<sup>133</sup>Xe), фтор (<sup>18</sup>F), <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh, <sup>97</sup>Ru, <sup>68</sup>Ge, <sup>57</sup>Co, <sup>65</sup>Zn, <sup>85</sup>Sr, <sup>32</sup>P, <sup>153</sup>Gd, <sup>169</sup>Yb, <sup>51</sup>Cr, <sup>54</sup>Mn, <sup>75</sup>Se, <sup>113</sup>Sn и <sup>117</sup>Tl; позитронно-активные металлы с использованием различных позитронно-эмиссионных томографов; нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов; и молекулы, которые помечены радиоактивными изотопами или конъюгированы с конкретными радиоизотопами.

Связывание радиоизотопов с антителами может быть осуществлено с помощью обычных бифункциональных хелатов. Для связи радиоактивного серебра-111 и радиоактивного серебра-199 могут использоваться линкеры на основе серы. См. Hazra et al., *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Связывание радиоизотопов серебра может включать снижение иммуноглобулина аскорбиновой кислотой. Для радиоизотопов, таких как <sup>111</sup>In и <sup>90</sup>Y, можно использовать ибритумомаб тиуксетан, который будет вступать в реакцию с такими изотопами с образованием <sup>111</sup>In-ибритумомаб тиуксетана и <sup>90</sup>Y-ибритумомаб тиуксетана, соответственно. См. Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

Терапевтические соединения, другие белки, другие антитела и/или детектируемые метки могут быть соединены или конъюгированы, прямо или косвенно через промежуточное звено (например, линкер), с антителом по изобретению. См., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985); и Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Подходящие линкеры включают, например, расщепляемые и нерасщепляемые линкеры. Могут быть использованы различные линкеры, которые высвобождают связанные терапевтические соединения, белки, антитела и/или детектируемые метки в кислых или восстанавливающих условиях, при воздействии специфических протеаз или в других определенных условиях.

#### VI. Фармацевтические композиции и способы применения

В профилактических целях антитело или средство для индукции антитела или фармацевтическую композицию вводят пациенту, восприимчивому к заболеванию или имеющему другой риск развития заболевания (например, болезни Альцгеймера), по схеме (доза, частота и путь введения), эффективной для снижения риска, уменьшения тяжести или отсрочки появления по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В частности, схема предпочтительно является эффективной в отношении ингибирования или задержки тау или фосфо-тау и парных нитей, образованных из него в головном мозге, и/или ингибирования или задержки его токсических эффектов и/или ингибирования/или задержки развития поведенческих нарушений. В терапевтических целях антитело или средство для индукции антитела, вводят пациенту с подозрением на наличие или уже страдающему заболеванием (например, болезнью Альцгеймера) по схеме (доза, частота и путь введения), эффективной для облегчения или по меньшей мере препятствования дальнейшему ухудшению по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В частности, схема предпочтительно является эффективной для снижения или по меньшей мере ингибирования дальнейшего повышения уровней тау, фосфор-тау или парных нитей, образующихся из него, ассоциированных с ними токсичностей и/или поведенческих нарушений.

Схема считается терапевтически или профилактически эффективной, если у отдельного получавшего лечение пациента достигается более благоприятный результат, чем средний результат в контрольной популяции сопоставимых пациентов, не получавших лечение способами по изобретению, или если более благоприятный результат демонстрируется у получавших лечение пациентов по сравнению с контрольными пациентами в контролируемом клиническом исследовании (например, исследовании фазы II, фазы III или фазы III) на уровне  $p < 0,05$ ,  $0,01$  или даже  $0,001$ .

Эффективные дозы варьируются в зависимости от многих различных факторов, таких как способы введения, целевой участок, физиологическое состояние пациента, является ли пациент носителем APOE, является ли пациент человеком или животным, вводимые другие лекарственные препараты и является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

Примеры диапазонов дозировок антител составляют от около  $0,01$  до  $60$  мг/кг, или от около  $0,1$  до  $3$  мг/кг, или  $0,15$ - $2$  мг/кг, или  $0,15$ - $1,5$  мг/кг массы тела пациента. Антитело можно вводить в таких дозах ежедневно, через день, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально или по любому другому графику, определенному эмпирическим анализом. Пример лечения предполагает введение нескольких дозированных форм в течение длительного периода времени, например, в течение по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные примеры схем лечения предполагают введение один раз каждые две недели, или один раз в месяц, или один раз в каждые 3-6 месяцев.

Количество средства для активного введения варьируется от 0,1-500  $\mu\text{г}$  на пациента и более обычно от 1-100 или 1-10  $\mu\text{г}$  на инъекцию для введения человеку. Время введения инъекций может значительно варьироваться от одного раза в день до одного раза в год и одного раза в десять лет. Типичная схема состоит из иммунизации с последующими повторными инъекциями через определенные промежутки времени, например, 6 недель или два месяца. Другая схема состоит из иммунизации с последующими повторными инъекциями через 1, 2 и 12 месяцев. Другая схема предполагает введение каждые два месяца пожизненно. В качестве альтернативы бустерные инъекции могут быть нерегулярными, на что указывает мониторинг иммунного ответа.

Антитела или средства для индукции антител предпочтительно вводят периферическим путем (т.е. таким, при котором введенное или индуцированное антитело пересекает гематоэнцефалический барьер, чтобы достичь намеченного участка в головном мозге. Пути введения включают местное, внутривенное, пероральное, подкожное, внутриартериальное, внутричерепное, интратекальное, внутривентральное, интраназальное, внутриглазное, внутрикожное или внутримышечное. Некоторыми путями введения антител являются внутривенный и подкожный. Некоторыми путями активной иммунизации являются подкожный и внутримышечный. Этот тип инъекции чаще всего выполняется в мышцы руки или ноги. В некоторых способах средства вводят непосредственно в конкретную ткань, где накопились отложения, например, посредством внутривенной инъекции.

Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и практически изотоническими и производятся в условиях, соответствующих требованиям GMP. Фармацевтические композиции могут быть представлены в единичной лекарственной форме (т.е. дозированной форме для однократного введения). Фармацевтические композиции могут быть составлены с использованием одного или более физиологически и фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ. Лекарственный состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекции антитела могут быть составлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнка, раствор Рингера или физиологический раствор или ацетатный буфер (для уменьшения дискомфорта в месте инъекции). Раствор может содержать составные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие вещества. В качестве альтернативы, антитела могут быть лиофилизированы для смешивания с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед применением.

Настоящие схемы можно вводить в комбинации с другим средством, эффективным для лечения или профилактики заболевания, которое подлежит лечению. Например, в случае болезни Альцгеймера настоящие схемы можно комбинировать с иммунотерапией против А $\beta$  (WO/2000/072880), ингибиторами холинэстеразы или мемантином, или в случае болезни Паркинсона иммунотерапией против альфа-синуклеина WO/2008/103472, леводопой, агонистами дофамина, ингибиторами COMT, ингибиторами MAO-B, амантадином или антихолинергическими средствами.

Антитела вводят по эффективной схеме, означающей дозировку, путь введения и частоту введения, которые задерживают начало, уменьшают тяжесть, ингибируют дальнейшее ухудшение и/или облегчают по меньшей мере один признак или симптом заболевания, подлежащего лечению. Если пациент уже страдает заболеванием, схему можно назвать терапевтически эффективной схемой. Если пациент находится в группе повышенного риска развития заболевания по сравнению с популяцией в целом, но еще не испытывает симптомов, схему можно назвать профилактически эффективной. В некоторых случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может наблюдаться у отдельного пациента относительно контроля истории болезни или прошлого опыта применения у того же пациента. В других случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может быть продемонстрирована в доклинических или клинических испытаниях на популяции получавших лечение пациентов по сравнению с контрольной популяцией не получавших лечение пациентов.

Примерами дозировок антитела являются 0,1-60 мг/кг (например, 0,5, 3, 10, 30 или 60 мг/кг) или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5 мг/кг) или 10-4000 мг или 10-1500 мг в виде фиксированной дозировки. Помимо прочих факторов дозировка зависит от состояния пациента и ответа на предшествующее лечение, если таковое проводилось, от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим, а также от того, является ли заболевание острым или хроническим.

Введение может быть парентеральным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутричерепным, интратекальным, внутривентральным, местным, интраназальным или внутримышечным. Некоторые антитела можно вводить в системный кровоток путем внутривенного или подкожного введения. Внутривенное введение может осуществляться, например, посредством инфузии в течение периода, например, 30-90 мин.

Частота введения, среди прочих факторов, зависит от периода полужизни антитела в кровотоке, состояния пациента и пути введения. Частота может быть следующей: ежедневно, еженедельно, ежемесячно, ежеквартально или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения в состоянии пациента или прогрессирование заболевания, которое подлежит лечению. Примером частоты внутривенного введения является диапазон от еженедельного до ежеквартального в зависимости от продолжительной причины

лечения, хотя также возможно более или менее частое дозирование. Для подкожного введения примерная частота дозирования составляет от ежедневного до ежемесячного, хотя также возможно более или менее частое дозирование.

Количество вводимых доз зависит от того, является ли заболевание острым или хроническим, и от ответа заболевания на лечение. При острых заболеваниях или обострениях хронического заболевания часто бывает достаточно введения от 1 до 10 доз. Иногда однократной болюсной дозы, необязательно в разделенной форме, достаточно для лечения острого заболевания или обострения хронического заболевания. Лечение можно повторить при рецидиве острого заболевания или в случае обострения. При хронических заболеваниях антитело можно вводить с регулярными интервалами, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, каждые шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет или в течение всей жизни пациента.

А. Способы диагностики и мониторинга

#### **Визуализация *in vivo*, способы диагностики и оптимизация иммунотерапии**

В изобретении предложены способы визуализации отложений тау *in vivo* (например, нейрофибриллярных клубков и включений тау) у пациента. Эти методы работают путем введения реагента, такого как антитело, которое связывает тау (например, мышинное, гуманизированное, химерное или венеризованное антитело 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3), пациенту с последующим обнаружением реагента после связывания. Могут быть использованы антитела, специфически связывающиеся с тау на эпитопе в пределах аминокислотных остатков QIVYKP (SEQ ID NO: 57), EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), EIVYKS (SEQ ID NO: 277) или (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56). В некоторых способах антитело связывается с пептидом, состоящим из эпитопа в пределах аминокислотных остатков QIVYKP (SEQ ID NO: 57), EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), EIVYKS (SEQ ID NO: 277) или (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56). Ответа на введенные антитела в виде выведения можно избежать или уменьшить с помощью фрагментов антител, не имеющих полноразмерной константной области, таких как Fab. В некоторых способах одно и то же антитело может служить в качестве как лекарственного средства, так и диагностического реагента.

Диагностические реагенты можно вводить путем внутривенной инъекции в организм пациента или непосредственно в головной мозг путем внутривенной инъекции или путем просверливания отверстия в черепе. Дозировка реагента должна быть в тех же пределах, что и для способов применения в качестве лечения. Как правило, реагент является меченым, хотя в некоторых способах первичный реагент с аффинностью к тау является немеченым, и для связывания с первичным реагентом используется вторичный агент, выступающий в качестве метки. 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 можно обнаружить с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

Способы визуализации отложений тау *in vivo* применимы для диагностики или подтверждения диагноза таупатии, такой как болезнь Альцгеймера, лобно-височная лобарная дегенерация, прогрессирующий надъядерный паралич и болезнь Пика или предрасположенности к такому заболеванию. Например, эти способы можно применять для пациентов с симптомами деменции. Если у пациента имеются аномальные нейрофибриллярные клубки, то он, скорее всего, страдает болезнью Альцгеймера. В качестве альтернативы, если у пациента имеются аномальные включения тау, то, в зависимости от расположения включений, пациент может страдать лобно-височной лобарной дегенерацией. Эти методы также можно применять для бессимптомных пациентов. Наличие аномальных отложений тау-белка указывает на предрасположенность к симптоматическому заболеванию в будущем. Способы также применимы для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение у пациентов, у которых ранее было диагностировано тау-ассоциированное заболевание.

Диагностика может быть выполнена путем сравнения количества, размера и/или интенсивности меченых локусов с соответствующими исходными значениями. Исходные значения могут представлять собой средние уровни в популяции не болеющих индивидуумов. Исходные значения также могут представлять собой предыдущие уровни, определенные у того же пациента. Например, исходные значения могут быть определены у пациента до начала лечения тау-иммунотерапией, а измеренные значения после этого могут быть сравнены с исходными значениями. Уменьшение значений относительно исходного уровня свидетельствует о положительном ответе на лечение.

У некоторых пациентов проведение ПЭТ-сканирования может помочь в диагностике таупатии. ПЭТ-сканирование может быть выполнено, например, с использованием обычного ПЭТ-сканера и вспомогательного оборудования. Сканирование обычно включает в себя одну или более областей головного мозга, которые, как правило, ассоциируются с отложениями тау-белка, и в качестве контроля одну или более областей, в которых обычно обнаруживается небольшое количество отложений, в случае их наличия.

Сигнал, обнаруженный при ПЭТ-сканировании, может быть представлен в виде многомерного изображения. Многомерное изображение может быть выполнено в двух плоскостях, представляющих поперечное сечение головного мозга, в трех плоскостях, представляющих трехмерное изображение головного

мозга, или в четырех плоскостях, представляющих изменения в трехмерном изображении головного мозга с течением времени. Можно использовать цветовую шкалу, где разные цвета обозначают разное количество метки и, предположительно, обнаруженное отложение белка тау. Результаты сканирования также могут быть представлены в числовом виде с числами, относящимися к количеству обнаруженной метки и, следовательно, количеству отложений тау-белка. Метка, присутствующая в области мозга, о которой известно, что она ассоциируется с отложениями при определенной тауопатии (например, болезни Альцгеймера), может быть сравнена с меткой, присутствующей в области, о которой известно, что она не ассоциируется с отложениями, чтобы получить соотношение, указывающее на степень отложений в первой области. Для одного и того же радиоактивно меченного лиганда такие соотношения обеспечивают сравнимую меру отложений тау-белка и их изменений у разных пациентов.

В некоторых способах ПЭТ-сканирование проводится одновременно с МРТ или КАТ или в тот же визит пациента. МРТ или КАТ обеспечивают более подробное изображение анатомических структур головного мозга, чем ПЭТ-сканирование. Однако изображение, полученное при ПЭТ-сканировании, может быть наложено на изображение МРТ или КАТ-сканирования, что более точно указывает на расположение ПЭТ-лиганда и, соответственно, отложений тау относительно анатомических структур в головном мозге. Некоторые аппараты могут выполнять как ПЭТ-сканирование, так и МРТ или КАТ-сканирование без изменения положения пациента между сканированиями, что облегчает наложение изображений.

Подходящие ПЭТ-лиганды включают радиоактивно меченные антитела по изобретению (например, мышинные, гуманизированные, химерные или венеризированные антитела 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3). Используемым радиоизотопом может быть, например,  $C^{11}$ ,  $N^{13}$ ,  $O^{15}$ ,  $F^{18}$  или  $I^{123}$ . Интервал между введением ПЭТ-лиганда и проведением сканирования может зависеть от ПЭТ-лиганда и, в частности, от скорости его поглощения и выведения в головной мозг, а также от периода полужизни его радиоактивной метки.

ПЭТ-сканирование также может проводиться в качестве профилактической меры у бессимптомных пациентов или у пациентов с симптомами легкого когнитивного нарушения, у которых еще не диагностирована тауопатия, но имеется повышенный риск развития тауопатии. В случае бессимптомных пациентов сканирование особенно полезно для лиц, считающихся подверженными повышенному риску развития тауопатии в связи с семейным анамнезом, генетическими или биохимическими факторами риска или зрелым возрастом. Профилактическое сканирование можно начинать, например, у пациента в возрасте от 45 до 75 лет. Некоторым пациентам первое сканирование проводят в возрасте 50 лет.

Профилактическое сканирование можно проводить с интервалом, например, от шести месяцев до десяти лет, предпочтительно от 1 до 5 лет. У некоторых пациентов профилактическое сканирование проводится ежегодно. Если ПЭТ-сканирование, выполненное в качестве профилактической меры, указывает на аномально высокие уровни отложений тау-белка, можно начать иммунотерапию и выполнить последующее ПЭТ-сканирование, как у пациентов с диагнозом тауопатия. Если ПЭТ-сканирование, проведенное в качестве профилактической меры, показывает уровень отложений тау-белка в пределах нормы, дальнейшее ПЭТ-сканирование можно проводить с интервалом от шести месяцев до 10 лет, а предпочтительно 1-5 лет, как и раньше, или в ответ на появление признаков и симптомов тауопатии или легкого когнитивного нарушения. Сочетая профилактическое сканирование с назначением тау-направленной иммунотерапии, если и когда обнаруживается уровень отложений тау-белка выше нормы, уровень отложений тау-белка может быть снижен до или ближе к нормальному уровню, или по меньшей мере сдержан от дальнейшего увеличения, и у пациента может отсутствовать тауопатия в течение более длительного периода времени, чем в случае отсутствия профилактического сканирования и тау-направленной иммунотерапии (например, по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 лет или до конца жизни пациента).

Нормальные уровни отложений тау-белка можно определить по количеству нейрофибриллярных клубков или включений тау в головном мозге репрезентативной выборки индивидуумов в общей популяции, у которых не была диагностирована конкретная тауопатия (например, болезнь Альцгеймера), и которые не считаются подверженными повышенному риску развития такого заболевания (например, репрезентативная выборка здоровых индивидуумов в возрасте до 50 лет). В качестве альтернативы, нормальный уровень может быть распознан у отдельного пациента, если сигнал ПЭТ в соответствии с настоящими способами в области головного мозга, в которой, как известно, развиваются отложения тау-белка, не отличается (в пределах точности измерения) от сигнала от области головного мозга, в которой, как известно, такие отложения обычно не образуются. Повышенный уровень у человека может быть распознан путем сравнения с нормальными уровнями (например, за пределами среднего значения и дисперсией стандартного отклонения) или просто по повышенному сигналу за пределами экспериментальной ошибки в области головного мозга, ассоциированной с отложениями тау-белка по сравнению с областью, которая не ассоциируется с отложениями. Для целей сравнения уровней отложений тау-белка у индивидуума и популяции, отложения тау-белка предпочтительно определять в одной и той же области (областях) головного мозга, причем эти области включают по меньшей мере одну область, в которой, как известно, образуются отложения тау-белка, ассоциированные с конкретной тауопатией (например, болезнью Альцгеймера). Пациент с повышенным уровнем отложений тау-белка является кандидатом на начало иммунотерапии.

После начала иммунотерапии снижение уровня отложений тау-белка можно сначала рассматривать как показатель того, что лечение дает желаемый эффект. Наблюдаемое снижение может находиться, например, в диапазоне 1-100%, 1-50% или 1-25% от исходного значения. Такие эффекты могут быть измерены в одной или более областях головного мозга, в которых, как известно, образуются отложения, или могут быть измерены в среднем по таким областям. Общий эффект лечения можно приблизительно оценить, добавив процентное снижение относительно исходного уровня к увеличению отложений тау-белка, которое в противном случае произошло бы у среднестатистического не получающего лечения пациента.

Поддержание отложений тау-белка на приблизительно постоянном уровне или даже небольшое увеличение отложений тау-белка также может быть признаком ответа на лечение, хотя и субоптимального ответа. Такие реакции можно сравнить с динамикой уровней отложений тау-белка у пациентов с определенной таупатией (например, болезнью Альцгеймера), которые не получали лечения, чтобы определить, оказывает ли иммунотерапия эффект на ингибирование дальнейшего увеличения отложений тау-белка.

Мониторинг изменений отложений тау-белка позволяет корректировать схему иммунотерапии или другого лечения в ответ на лечение. ПЭТ-мониторинг позволяет определить характер и степень ответа на лечение. Затем можно определить, следует ли корректировать лечение, и, если это желательно, лечение может быть скорректировано в ответ на ПЭТ-мониторинг. Таким образом, ПЭТ-мониторинг позволяет скорректировать тау-направленную иммунотерапию или другую схему лечения до того, как другие биомаркеры, МРТ или когнитивные меры дадут заметный ответ. Существенное изменение означает, что сравнение значения параметра после лечения по сравнению с исходным уровнем дает некоторые доказательства того, что лечение привело или не привело к благоприятному эффекту. В некоторых случаях изменение значений параметра у самого пациента свидетельствует о том, что лечение привело или не привело к благоприятному эффекту. В других случаях изменение значений, если оно имеется, у пациента сравнивается с изменением значений, если оно имеется, в репрезентативной контрольной популяции пациентов, не проходящих иммунотерапию. Отличие ответа у конкретного пациента от нормального ответа у пациента в контрольной группе (например, среднее значение плюс дисперсия стандартного отклонения) также может служить доказательством того, что схема иммунотерапии позволяет или не позволяет достичь благоприятного эффекта у пациента.

У некоторых пациентов мониторинг показывает обнаруживаемое снижение отложений тау-белка, но уровень отложений тау-белка остается выше нормы. У таких пациентов, если нет неприемлемых побочных эффектов, схему лечения можно продолжать как есть или даже увеличить частоту введения и/или дозу, если еще не достигнута максимальная рекомендуемая доза.

Если мониторинг показывает, что уровень отложений тау-белка у пациента уже снижен до нормального или практически нормального уровня, схема иммунотерапии может быть изменена с индукционной (т.е. снижающей уровень отложений тау-белка) на поддерживающую (т.е. поддерживающую отложения тау-белка на приблизительно постоянном уровне). На такую схему можно повлиять путем снижения дозы и/или частоты введения иммунотерапии.

У других пациентов мониторинг может показать, что иммунотерапия оказывает определенное благоприятное воздействие, но эффект является субоптимальным. Оптимальный эффект может быть определен как процентное снижение уровня отложений тау-белка в пределах верхней половины или квартиля изменения отложений тау-белка (измеренного или рассчитанного по всему головному мозгу или его репрезентативной области (областям), в которых, как известно, образуются отложения тау-белка), наблюдаемое в репрезентативной выборке пациентов с таупатией, проходящих иммунотерапию в данный момент времени после начала терапии. Пациент, у которого наблюдается меньшее снижение или пациент, у которого отложения тау-белка остаются неизменными или даже увеличиваются, но в меньшей степени, чем ожидалось в отсутствие иммунотерапии (например, по данным контрольной группы пациентов, не получавших иммунотерапию), может быть классифицирован как имеющий положительный, но субоптимальный ответ. У таких пациентов, необязательно, может быть проведена корректировка схемы, при которой доза и или частота применения средства увеличивается.

У некоторых пациентов отложения тау-белка могут увеличиваться аналогично или в большей степени, чем отложения тау у пациентов, не получающих иммунотерапию. Если такое увеличение сохраняется в течение определенного периода времени, например, 18 месяцев или 2 лет, даже после любого увеличения частоты или дозы средств, иммунотерапия при желании может быть прекращена в пользу других вариантов лечения.

Вышеизложенное описание диагностики, мониторинга и корректировки лечения таупатий было в основном посвящено применению ПЭТ-сканирования. Однако любой другой способ визуализации и/или измерения отложений тау-белка, который допускает применение антител к тау по изобретению (например, мышинового, гуманизированного, химерного или венированного антитела 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 или 14H3), может быть использован вместо ПЭТ-сканирования для осуществления таких способов.

Также предложены способы выявления иммунного ответа на тау у пациента, страдающего или предрасположенного к заболеваниям, ассоциированным с тау. Способы могут быть использованы для

мониторинга хода терапевтического и профилактического лечения агентами, предложенными в данном документе. Профиль антител после пассивной иммунизации как правило показывает немедленный пик концентрации антител, за которым следует экспоненциальный спад. Без дополнительной дозы снижение приближается к уровню до лечения в течение периода от нескольких дней до нескольких месяцев в зависимости от периода полураспада введенного антитела. Например, период полураспада некоторых человеческих антител составляет порядка 20 дней.

В некоторых способах перед введением препарата проводится измерение исходного уровня антител к тау у субъекта, вскоре после этого проводится второе измерение для определения пикового уровня антител, и еще одно или более измерений проводятся через определенные промежутки времени для контроля снижения уровня антител. Когда уровень антитела снизился до исходного уровня или до предварительно определенного процента пика меньше исходного уровня (например, 50%, 25% или 10%), вводится следующая доза антитела. В некоторых способах пиковые или последующие измеренные уровни за вычетом фоновых сравниваются с эталонными уровнями, которые ранее были определены как благоприятные для профилактической или терапевтической схемы лечения у других субъектов. Если измеренный уровень антител значительно меньше контрольного уровня (например, меньше среднего значения минус одно или, предпочтительно, два стандартных отклонения от контрольного значения в популяции субъектов, получающих пользу от лечения), показано введение дополнительной дозы антитела.

Также предложены способы обнаружения тау у субъекта, например, путем измерения тау в образце, полученном от субъекта, или путем визуализации тау *in vivo* у субъекта. Такие способы применимы для диагностики или подтверждения диагноза заболеваний, ассоциированных с тау, или предрасположенности к ним. Эти методы также можно применять у бессимптомных субъектов. Наличие тау указывает на предрасположенность к симптоматическому заболеванию в будущем. Способы также применимы для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение у субъектов, у которых ранее были диагностированы болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная тауопатия, постэнцефалитный паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Нимана-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен, глобулярная глиальная тауопатия, боковой амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), глобулярная глиальная тауопатия (ГГТ), болезнь Паркинсона или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

Биологические образцы, полученные от субъекта, у которого имеется, подозревается наличие или существует риск развития болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной тауопатии, постэнцефалитного паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Нимана-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен, глобулярной глиальной тауопатии, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ), глобулярной глиальной тауопатии (ГГТ), болезни Паркинсона или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), могут быть приведены в контакт с раскрытыми в данном документе антителами для оценки наличия тау. Например, уровни тау у таких субъектов можно сравнить с уровнями, присутствующими у здоровых субъектов. Альтернативно, уровни тау у таких субъектов, получающих лечение заболевания, могут быть сравнены с уровнями тау у субъектов, ранее не получавших лечение по поводу болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной тауопатии, постэнцефалитного паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Нимана-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен, глобулярной глиальной тауопатии, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ), глобулярной глиальной тауопатии (ГГТ), болезни Паркинсона или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП). Некоторые из таких тестов включают биопсию ткани, взятой у таких субъектов. Анализ методом твердофазного ИФА также могут быть пригодными способами, например, для оценки содержания тау в образцах жидкости.

#### VII. Наборы

В изобретении также предложены наборы (например, контейнеры), включающие антитело, раскрытое в данном документе, и сопутствующие материалы, такие как инструкция по применению (например, листок-вкладыш). Инструкция по применению могут содержать, например, инструкции по введению антитела и, необязательно, одного или более дополнительных средств. Контейнеры могут быть стандартными дозами, упаковками со множеством доз (например, многодозовыми упаковками) или частичными дозами.

Листок-вкладыш относится к инструкциям, обычно включаемым в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся применения таких терапевтических продуктов

Наборы также могут включать в себя второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (БВДИ), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Набор может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

#### VIII. Другие способы применения

Антитела можно использовать для обнаружения тау или его фрагментов в контексте клинической диагностики или лечения, или в исследованиях. Например, антитела можно использовать для обнаружения присутствия тау в биологическом образце в качестве индикатора того, что биологический образец содержит отложения тау. Связывание антител с биологическим образцом можно сравнить со связыванием антител с контрольным образцом. Контрольный образец и биологический образец могут содержать клетки, происходящие из одной и той же ткани. Контрольные образцы и биологические образцы могут быть получены от одного и того же человека или от разных людей и по одному и тому же случаю или по разным случаям. Если желательно, несколько биологических образцов и несколько контрольных образцов оцениваются многократно для защиты от случайных вариаций, не зависящих от различий между образцами. Затем можно провести прямое сравнение между биологическим образцом (образцами) и контрольным образцом (образцами), чтобы определить, увеличилось ли связывание антител (т.е. присутствие тау) с биологическим образцом (образцами), уменьшилось ли оно или осталось прежним по сравнению со связыванием антител с контрольным образцом (образцами). Повышенное связывание антител с биологическим образцом (образцами) по сравнению с контрольным образцом (образцами) указывает на присутствие тау в биологическом образце (образцах). В некоторых случаях повышенное связывание антител является статистически значимым. Необязательно, связывание антител с биологическим образцом по меньшей мере в 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20 или 100 раз выше связывания антител с контрольным образцом.

Кроме того, антитела могут быть применены для обнаружения наличия тау в биологическом образце для мониторинга и оценки эффективности терапевтического средства, используемого для лечения пациента, у которого диагностирована болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная тауопатия, постэнцефалитный паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Нимана-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен, глобулярная глиальная тауопатия, боковой амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), глобулярная глиальная тауопатия (ГГТ), болезнь Паркинсона или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная тауопатия, постэнцефалитный паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Нимана - Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен, глобулярная глиальная тауопатия, боковой амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), глобулярная глиальная тауопатия (ГГТ), болезнь Паркинсона или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), оценивают для установления исходного уровня связывания антител с образцом (т.е. исходного уровня наличия тау в образце) перед началом терапии терапевтическим средством. В некоторых случаях несколько биологических образцов, полученных от пациента, оцениваются многократно, чтобы установить как исходный уровень, так и меру случайной вариации, не зависящей от лечения. Затем вводят терапевтическое средство по схеме. Схема может включать многократное введение средства в течение периода времени. Необязательно, связывание антител (т.е. присутствие тау) оценивается в нескольких случаях в нескольких биологических образцах, полученных от пациента, как для определения меры случайной вариации, так и для выявления тенденции в ответ на иммунотерапию. Затем сравнивают различные оценки связывания антител с биологическими образцами. Если проведены только две оценки, можно провести прямое сравнение между двумя оценками, чтобы определить, увеличилось ли связывание антител (т.е. присутствие тау), уменьшилось или осталось неизменным между двумя оценками. Если выполнено более двух измерений, измерения можно проанализировать как временной интервал, начинающийся до лечения терапевтическим средством и продолжающийся в течение всего курса терапии. У пациентов, у которых уменьшилось связывание антител с биологическими образцами (т.е. наличие тау), можно сделать вывод, что терапевтическое средство было эффективно при лечении болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной тауопатии, постэнцефалитного паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Нимана-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-

височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен, глобулярной глиальной тауопатии, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ), глобулярной глиальной тауопатии (ГГТ), болезни Паркинсона или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП) у пациента. Уменьшение связывания антител может быть статистически значимым. Необязательно, связывание уменьшается по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. Оценка связывания антител может проводиться в сочетании с оценкой других признаков и симптомов болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной тауопатии, постэнцефалитного паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Нимана-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен, глобулярной глиальной тауопатии, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ), глобулярной глиальной тауопатии (ГГТ), болезни Паркинсона или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП).

Антитела также можно использовать в качестве исследовательских реагентов для лабораторных исследований по обнаружению тау или его фрагментов. В таких случаях антитела могут быть помечены флуоресцентными молекулами, спин-меченными молекулами, ферментами или радиоизотопами и могут быть предоставлены в виде набора со всеми необходимыми реагентами для выполнения анализа обнаружения. Антитела также можно использовать для очистки тау или партнеров связывания тау, например, с помощью аффинной хроматографии.

Все поданные патентные заявки, другие публикации, номера доступа и т.п., цитируемые выше или ниже, в полном объеме и во всех отношениях включены посредством ссылки в той же степени, как если бы для каждого отдельного пункта было специально и отдельно указано его включение посредством ссылки. Если с учетным номером в разное время связаны разные версии последовательности, подразумевается версия, связанная с номером доступа на момент действительной даты подачи данной заявки. Действительная дата подачи означает более раннюю фактическую дату подачи или дату подачи приоритетной заявки, ссылающейся на учетный номер, если это применимо. Аналогично, если разные версии публикации, веб-сайта и т.п. опубликованы в разное время, подразумевается версия, опубликованная ближе всего к действительной дате подачи заявки, если не указано иное. Любой признак, этап, элемент, вариант реализации или аспект изобретения можно использовать в комбинации в любыми другими, если четко не указано иное. Хотя настоящее изобретение было достаточно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях ясности понимания, является очевидным, что на практике можно вносить определенные изменения и модификации в рамках объема прилагаемой формулы изобретения.

### Примеры

#### Пример 1. Идентификация и скрининг моноклональных антител тау

Иммунизации проводили с помощью рекомбинантного человеческого тау (4R0N) из 383 а/к, меченого на N-конце His-меткой, содержащего мутацию P301S [иммуноген А] или рекомбинантного человеческого тау (4R0N) из 383 а/к, содержащего мутацию P301S, лишенного N-концевой His-метки [иммуноген В]. Иммуногены эмульгировали в адьюванте РИБИ.

Самок мышей линии А/Ј в возрасте пяти недель иммунизировали внутрибрюшинно 25 мкг иммуногена А в день 0 и 10 мкг иммуногена А, каждый в дни 7, 14, 21, 27, 34, 48 и 55. Для антитела 10С12 в день 43 у мышей брали кровь и титровали против иммуногена А. Животным с наивысшими титрами вводили бустер-дозу в день 54 с помощью терминальной иммунизации 50 мкг иммуногена А, который вводили 1/2 внутрибрюшинно и 1/2 внутривенно.

В отношении антител 9F5, 17С12, 2D11, 14Н3 и 12С4 животных иммунизировали дополнительными 10 мкг иммуногена А в день 62 и 10 мкг иммуногена В в дни 76 и 90. В дни 43 и 98 у мышей брали кровь и титровали против иммуногена А. Животным с наивысшими титрами вводили бустер-дозу в день 101 день с помощью терминальной иммунизации 50 мкг иммуногена В, который вводили 1/2 внутрибрюшинно и 1/2 внутривенно. Для всех антител слитые гибридомы подвергали скринингу с помощью твердофазного ИФА в отношении обоих иммуногенов.

Анализ интернализации с использованием сортировки активированных флуоресценцией клеток (FACS) выполняли для оценки способности различных антител блокировать интернализацию тау нейронами. Антитела, которые блокируют интернализацию, скорее всего, блокируют передачу тау. pHodo-меченный растворимый олигомер тау P301L (конечная концентрация 1,5 мкг/мл) предварительно инкубировали с антителами к тау (титрование дозы: начальная концентрация 80 мкг/мл с последующими 4-кратными серийными разведениями) в течение 30 мин при комнатной температуре в среде для культивирования клеток. Затем смесь ТАУ/антитела добавляли к клеточным линиям нейробластомы В103 при конечной концентрации 500 000 клеток/мл и инкубировали в течение 3-4 ч при 37°C в инкубаторе для тканевых культур (5% CO<sub>2</sub>). Затем клетки промывали 3 раза культуральной средой с последующей 10-

минутной инкубацией в культуральной среде и дважды промывали буфером FACS (1% ФБС в ФСБ). Клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и при средней интенсивности флуоресценции техасским красным, измеренной с помощью FACS LSR II. Флуоресценция техасским красным pHrodo активируется низким pH, связанным с эндоллизосомными компартментами при интернализации. Поскольку FACS обнаруживает клетки, а pHrodo флуоресцирует только при интернализации, будет обнаружен только тау, интернализированный клетками. Чем ниже средняя интенсивность флуоресценции, тем меньше количество интернализированного тау, что предполагает более высокую блокирующую активность тестируемого антитела. Как показано в табл. 55 и на фиг. 3, мышинное антитело 3D6 (WO 2017/191560) и мышинное антитело 9F5 блокируют интернализацию нейронов значительно больше, чем другие протестированные антитела. Мышинное 9F5 было выбрано на основе его нового эпитопа и результатов анализа pHrodo.

Таблица 55. Результаты анализа интернализации с мышинными антителами 9F5, 3D6, 5G8, 16G7 и 16B5

Все значения показывают % от максимального сигнала по сравнению с клетками без обработки						
	Контроль	3D6	9F5	5G8	16G7	16B5
Концентрация антитела (мкг/мл)						
62,5	87,7±4,8	14,2±1,7	18,1±5	77,7±3,2	33,9±1,3	61,9±5,7
15,625	86,2±2,6	31±1,6	24,2±3,9	88,1±7,6	51,4±0,8	72,8±6,2
3,9	81,2±5,3	41,2±2,2	35,9±4,2	94,3±5,3	62,2±6,5	80,1±3,1
0,98	75,4±4,8	64,3±0,6	71±6,0	78,8±3,7	56±4,3	88,1±9,1
0,244	82,9±1,5	82,2±9,2	71,7±6,5	86±4,6	74,6±7,6	85,9±1,6
0,061	84,5±4,9	78,4±9,2	78,1±8,6	86,3±4,1	85,3±6,7	88,2±1,3
0	93,3±0,2	93,3±0,2	93,3±0,2	93,3±0,2	93,3±0,2	93,3±0,2

Как показано в табл. 56 и на фиг. 15, мышинное антитело 10C12, мышинное антитело 12C4, мышинное антитело 2D11, мышинное антитело 17C12 и мышинное антитело 14H3 блокируют интернализацию нейронов в той же степени, что и антитело 9F5. Интернализация тау в нейроны является важным начальным шагом в распространении и патогенезе тау, и антитела, которые блокируют этот процесс, могут иметь общие признаки. Мышинное антитело 10C12, мышинное антитело 12C4, мышинное антитело 2D11, мышинное антитело 17C12 и мышинное антитело 14H3 были отобраны на основании результатов анализа pHrodo.

Таблица 56. Результаты анализа интернализации с мышинными антителами 9F5, 10C12, 17C12, 2D11, 14H3 и 12C4

Все значения показывают % от максимального сигнала по сравнению с клетками без обработки							
	Контроль	9F5	10C12	17C12	2D11	14H3	12C4
Концентрация антитела (мкг/мл)							
62,5	87,7±4,8	18,1±5	34,5±3,7	30,6±1,8	28,4±3,6	48,4±3,5	37,3±3,5
15,625	86,2±2,6	24,2±3,9	38,9±1,5	32,4±4,8	28,6±2,9	53,2±3,2	36,6±1,9
3,9	81,2±5,3	35,9±4,2	55,2±1,7	36,8±2,5	43±3,3	63,1±9,9	42,6±3,2
0,98	75,4±4,8	71±6,0	90,5±3,6	63,9±4,2	62,7±4,8	67,8±9,7	69,7±7,0
0,244	82,9±1,5	71,7±6,5	9,09±4,9	78,6±0,8	79,5±8,2	66±5,6	78,6±5,1
0,061	84,5±4,9	78,1±8,6	86,7±4,0	79,8±4,7	71,5±6,4	79,7±6,8	78,2±7,1
0	93,3±0,2	93,3±0,2	93,3±0,1 9	93,7±0,7	93,3±0,2	93,3±0,2	93,7±0,7

Пример 2. Картирование эпитопов мышинных антител 9F5, 2D11, 10C12, 17C12, 12C4 и 14H3 с помощью анализа методом твердофазного ИФА

Для картирования твердофазного ИФА использовали пептиды, охватывающие всю длину тау. Пептиды содержали 15 аминокислот с перекрытием в 5 аминокислот. Чтобы обеспечить связывание с поверхностью стрептавидина, пептиды также содержали N-концевой биотин. Пептиды инкубировали на планшете, покрытом стрептавидином, а планшет блокировали с применением 1% БСА в 1× ФСБ. После промывки антитела инкубировали на планшетах в течение 1 ч при комнатной температуре и промывали. Затем планшеты покрывали козьей антимышиной пероксидазой хрена (HRP) и промывали. Планшеты проявляли с помощью OPD, оптическую плотность считывали при 490 нм.

Данные твердофазного ИФА показывают, что мышинное антитело 9F5, мышинное антитело 10C12, мышинное антитело 2D11, мышинное антитело 17C12, мышинное антитело 12C4 и мышинное антитело 14H3 прочно связывают пептиды, содержащие остатки 302-316, а также остатки 383-397 самой длинной изоформы тау в ЦНС (441aa, Uniprot ID P10636-8; SEQ ID NO: 1). Оба пептида 302-316 и 383-397 содержат повтор "IVYK" (SEQ ID NO: 276), который, как было показано, важен для агрегации и самоассоциации тау, и формирует ядро В-листа агрегатов тау; кроме того, было продемонстрировано, что он является важным местом для высева тау. Это может позволить мышинному антителу 9F5, мышинному антителу 10C12, мышинному антителу 2D11, мышинному антителу 17C12, мышинному антителу 12C4 и мышинному антителу 14H3 связывать целый ряд агрегированных конформеров по сравнению с другими антителами, связывающими области в MTBR. Кроме того, было продемонстрировано, что повтор "IVYK" (SEQ ID NO: 276) является важным участком для высева тау, что позволяет предположить, что связывание с антителом в этой области может прервать прогрессирование патологии тау или использоваться в диагностических целях для выявления видов, способных к высеву.

Пример 3. Картирование эпитопов мышинных антител 9F5, 2D11, 10C12 и 17C12 с помощью микроматричного анализа пептидов

#### Способ

Анализ эпитопов 9F5, 2D11, 10C12 и 17C12 выполняли с помощью микроматричного анализа пептидов. Последовательность полноразмерного тау человека (441 аминокислота) была связана и удлинена с помощью нейтральных линкеров GSGSGS (SEQ ID NO: 59) на C- и N-конце, чтобы избежать усеченных пептидов. Связанная и удлинённая последовательность антигена транслировалась в пептиды из 15 аминокислот с пептид-пептидным перекрытием 14 аминокислот. Полученные пептидные микроматрицы содержали 441 различных пептидов, напечатанных в двух повторностях (882 пептидных пятна), и были обрамлены дополнительными контрольными пептидами HA (YPYDVPDYAG, SEQ ID NO: 60, 82 пятна).

После синтеза микроматрицу блокировали для предотвращения неспецифического связывания (номер по каталогу Rockland MB-070). Затем мышинное антитело 9F5 наносили на микроматрицу в концентрации 1 мкг/мл вместе с мышинным моноклональным антителом к HA (12CA5) DyLight800 (0,5 мкг/мл) в течение 16 ч при 4°C со встряхиванием при 140 об/мин. Микроматрицу промывали и наносили вторичное антитело (козьё антимышиное антитело класса IgG (H+L) DyLight680 (0,2 мкг/мл) на 45 мин при комнатной температуре. После дополнительной промывки микроматрицу визуализировали с помощью системы визуализации Licor Odyssey.

Количественная оценка интенсивности пятен и аннотация пептидов были основаны на 16-битных tiff-файлах серой шкалы при интенсивности сканирования 7/7, которые демонстрируют более высокий динамический диапазон, чем 24-битные цветные tiff-файлы; анализ изображений микроматриц проводили с помощью анализатора PepSlide®. Программный алгоритм разделяет интенсивности флуоресценции каждого пятна на необработанный сигнал, сигнал переднего плана и фоновый сигнал и вычисляет усреднённую медианную интенсивность переднего плана и межпозиционные отклонения повторностей пятен (см. вкладки "Необработанные данные"). На основе усреднённых средних значений интенсивности переднего плана была создана карта интенсивности, и взаимодействия на карте пептидов были выделены цветовым кодом интенсивности: красным для обозначения высокой интенсивности и белым для обозначения низкой интенсивности пятен. Допускалось максимальное отклонение от пятна к пятну в 40%, в противном случае соответствующее значение интенсивности обнулялось.

#### Результаты

В случае мышинного антитела 9F5, мышинного антитела 10C12 и мышинного антитела 17C12 наблюдался очень сильный ответ моноклонального антитела против двух эпитопоподобных пятен, образованных смежными пептидами с очень похожими консенсусными мотивами QIVYKP (SEQ ID NO: 57) и EIVYKSP (SEQ ID NO: 58), соответствующими аминокислотным последовательностям 307-312 и 391-397 соответственно самой длинной изоформы тау (441aa, Uniprot ID P10636-8; SEQ ID NO: 1). Это указывает на эпитоп (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56) для мышинного 9F5, мышинного 10C12 и мышинного 17C12.

В случае мышинного антитела 2D11 наблюдался очень сильный ответ моноклонального антитела против двух эпитопоподобных пятен, образованных смежными пептидами с очень похожими консенсусными мотивами QIVYKP (SEQ ID NO: 57) и EIVYKS (SEQ ID NO: 277), соответствующими аминокислотным последовательностям 307-312 и 391-396 соответственно самой длинной изоформы тау (441aa, Uniprot ID P10636-8; SEQ ID NO: 1). Это указывает на эпитоп (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 56) для мы-

шиного 2D11.

#### Пример 4. Конструирование гуманизованных антител 9F5

Исходным или донорским антителом для гуманизации было мышинное антитело 9F5. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи зрелого m9F5 представлена как SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность вариабельной легкой цепи зрелого m9F5 представлена как SEQ ID NO: 11. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно композитному определению по Kabat/Chothia представлены как SEQ ID NO: 8-10 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи по Kabat представлены как SEQ ID NO: 12-14, соответственно. Во всем тексте используется нумерация по Kabat.

Переменная каппа (Vk) 9F5 принадлежит к мышинной подгруппе 2 по Kabat, которая соответствует человеческой подгруппе 2 по Kabat, а переменная тяжелой цепи (Vh) принадлежит к мышинной подгруппе 2с по Kabat, которая соответствует человеческой подгруппе 1 по Kabat [Kabat E.A., et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242]. CDR-L1 по Chothia 16 остатков подобна каноническому классу 4 по Chothia, CDR-L2 по Chothia 7 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia, CDR-L3 по Chothia 9 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia [Martin ACR. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. В: Kontermann R and Dübel S (eds). Antibody Engineering. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.. [Martin, 2010]. CDR-H1 по Chothia 10 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia, CDR-H2 по Chothia 17 остатков подобна каноническому классу 2 по Chothia [Martin, 2010]]. CDR-H3 по Chothia 3 остатков не имеет канонических классов. Был проведен поиск последовательностей белков в базе данных PDB [Deshpande N, et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33: D233-7], чтобы найти конструкции, которые обеспечили бы приблизительную структурную модель 9F5. Кристаллическая структура Fab антитела с кодом pdb 50BF [Vicentini, et al., 2017, не опубликовано] использовалась как для структуры Vh, так и для Vk, поскольку она имела хорошее разрешение (1,92Å) и общее сходство последовательностей с Vh и Vk 9F5, сохраняя те же канонические структуры для петель.

Каркасы VH 9F5 имеют высокую степень сходства последовательностей с соответствующими областями Fab гуманизованного 48G7 PDB: 2RCS, сконструированного Wedemayer, G.J. et al. (1997, Science 276: 1665-1669) и тяжелой цепи AAN16432, клонированного McElhiney, J. et al (2002, Appl. Environ. Microbiol. 68 (11), 5288-5295). Вариабельные домены 9F5 и Fab AAN16432 и 48G7 также имеют одинаковую длину в отношении петель CDR-H1, H2. Точно так же каркасы VL 9F5 имеют высокую степень сходства последовательностей с соответствующими областями VL человеческого антитела CAB51297 и VL 1911357B, клонированных Capello et al (исх. номер в GenBank CAB51297, подано 20 июля 1999 г., не опубликовано) и Cooper L.J, et al. (1993, J. Immunol. 150 (6), 2231-2242) соответственно. Вариабельный домен легкой цепи антител 9F5, CAB51297 и 1911357B также имеет одинаковую длину в отношении петель CDR-L1, L2 и L3. Соответственно, каркасные области VH AAN16432 и VH 48G7 (2RCS-VH), а также VL CAB51297 и VL 1911357B были выбраны в качестве гибридных акцепторных последовательностей для CDR 9F5. Модель CDR 9F5, привитых к соответствующим человеческим каркасам для VH и VL, была построена и использовалась в качестве руководства для дальнейших обратных мутаций.

Последовательности вариантов тяжелой и легкой цепей, полученные в результате процесса гуманизации антител, дополнительно выравнивали с последовательностями зародышевой линии человека с использованием инструмента IMGT Domain GapAlign для оценки степени гуманизации тяжелой и легкой цепей, как указано в руководящих принципах комитета ВОЗ по МНН. (WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review) (Internet) 2014. Доступно по адресу: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) Остатки были изменены для выравнивания с соответствующей последовательностью зародышевой линии человека, где это возможно, для повышения степени гуманизации и снижения потенциальной иммуногенности. Для гуманизованных вариантов VLv2, VLv3, VLv4, VLv5, VLv6, VLv7, VLv8 и VLv9 были введены мутации, чтобы сделать последовательности более похожими на ген зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37). Для гуманизованных вариантов VHv2, VHv3, VHv4, VHv5, VHv6, VHv7, VHv8, VHv9 и VHv10 были введены мутации, чтобы сделать последовательности более похожими на ген зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33)

Дополнительные версии hu9F5-VH и hu9F5-VL были сконструированы для обеспечения возможности оценки различных каркасных остатков на предмет их вклада в связывание антигена, термостабильность и иммуногенность, а также для оптимизации дезаминирования, окисления, N-гликозилирования, протеолиза и агрегации. Положения, рассматриваемые для мутации, включают те, которые... Положения, рассматриваемые для мутации, включают те, которые определяют канонические конформации CDR (обобщено в Martin, A.C.R. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. В: Kontermann R and Dübel S (eds). Antibody Engineering. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.), находятся в зоне Вернье (Foote J and Winter G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol Biol. 224(2):487-99.), локализуются на интерфейсе домена VH/VL (обобщено в Leger OJP and Saldanha J. (2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting. В: Shepherd P and Dean C (eds). Mono-

clonal Antibodies: a Practical Approach. Oxford, UK: Oxford University Press.), чувствительны к посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование или пироглютаминирование, заняты остатками, которые, как предполагается, могут конфликтовать с CDR, согласно модели CDR 9F5, привитых к каркасам VH и VL, или заняты остатками, которые редко встречаются среди секвенированных человеческих антител, где либо остаток родительского мышинового 9F5, либо какой-либо другой остаток гораздо более распространен в репертуаре человеческих антител.

Выравнивания мышинового 9F5 и различных гуманизированных антител показаны для переменных областей легкой цепи (табл. 7 и фиг. 2A-2B, 5A-5B, 6A-6C) и переменных областей тяжелой цепи (табл. 6 и фиг. 1A-1B, 4A-4B).

Были сконструированы 10 вариантов переменной области гуманизированной тяжелой цепи и 9 вариантов переменной области гуманизированной легкой цепи, содержащие различные перестановки замен: hu9F5VHv1, hu9F5VHv2, hu9F5VHv3, hu9F5VHv4, hu9F5VHv5, hu9F5VHv6, hu9F5VHv7, hu9F5VHv8, hu9F5VHv9 или 9F5VHv10 (SEQ ID NO: 15-22, SEQ ID NO: 127-128, соответственно); и hu9F5VLv1, hu9F5VLv2, hu9F5VLv3, hu9F5VLv4, hu9F5VLv5, hu9F5VLv6, hu9F5VLv7, hu9F5VLv8 или hu9F5VLv9 (SEQ ID NO: 23-29, SEQ ID NO: 130-131, соответственно) (табл. 6 и 7). Примеры гуманизированных конструкций Vk и Vh с обратными мутациями и другими мутациями, основанными на выбранных каркасах человека, показаны в табл. 6 и 7 соответственно. Области, выделенные жирным шрифтом, в табл. 6 и 7, обозначают CDR, согласно композитному определению по Kabat/Chothia. Знак "-" в столбцах табл. 6 и 7 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO: 15-22 и SEQ ID NO: 127-128 и SEQ ID NO: 23-29, и SEQ ID NO: 130-131 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в табл. 8. Аминокислоты в положениях в hu9F5VHv1, hu9F5VHv2, hu9F5VHv3, hu9F5VHv4, hu9F5VHv5, hu9F5VHv6, hu9F5VHv7, hu9F5VHv8, hu9F5VHv9 и hu9F5VHv10 приведены в табл. 9. Аминокислоты в положениях в hu9F5VLv1, hu9F5VLv2, hu9F5VLv3, hu9F5VLv4, hu9F5VLv5, hu9F5VLv6, hu9F5VLv7, hu9F5VLv8 и hu9F5VLv9 являются приведены в табл. 10. Hu9F5VLv8 с заменой N60D также известен как hu9F5VLv9.

Процентный показатель степени гуманизации для гуманизированных VH цепей hu9F5VHv1, hu9F5VHv2, hu9F5VHv3, hu9F5VHv4, hu9F5VHv5, hu9F5VHv6, hu9F5VHv7, hu9F5VLv8, hu9F5VHv9 и hu9F5VHv10 (SEQ ID NO: 15-22 и SEQ ID NO: 127-128 соответственно) по отношению к наиболее сходному гену зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33), и для гуманизированных VL цепей hu9F5VLv1, hu9F5VLv2, hu9F5VLv3, hu9F5VLv4, hu9F5VLv5, hu9F5VLv6, hu9F5VLv7, hu9F5VLv8 и hu9F5VLv9 (SEQ ID NO: 23-29 и SEQ ID NO: 130-131, соответственно) по отношению к наиболее сходному гену зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37), показан в табл. 11.

Таблица 6

Остаток по Kabat №	Линейный остаток №	FR или CDR	VH мышиного 9F5 (SEQ ID NO:7)	IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:31)	AAI16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32)	Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)
1	1	Fr1	E	E	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	L	L	L	L	L	L	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	V	V	V	V	V	V	V	K	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	S	T	S	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18	18	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	I	V	L	L	I	I	I	I	I	I	I	I	I

21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	T	K	K	T	T	T	T	K	K	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR -H1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	CDR -H1	F	Y	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	CDR -H1	N	T	T	N	N	N	N	T	T	T	N	N	N	N
29	29	CDR -H1	I	F	L	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
30	30	CDR -H1	K	T	T	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
31	31	CDR -H1	D	D	E	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
32	32	CDR -H1	D	Y	L	T	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
33	33	CDR -H1	Y	Y	S	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
		-H1														
35	35	CDR -H1	N	H	H	H	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
35A		CDR -H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
35B		CDR -H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	Q	R	K	K	K	K	K	K	K	R	R	Q	K
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	R	R	R	R	R	R	A	A	A	R	R
41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	G	E	E	E	E	E	E	E	G	G	G	E
43	43	Fr2	R	K	K	Q	Q	Q	Q	Q	K	K	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	M	I	I	I	I	I	I	M	I	I	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR	W	L	G	R	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W

		-H2														
51	51	CDR -H2	I	V	F	I	I	I	I	I	V	V	V	V	I	I
52	52	CDR -H2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
52A	53	CDR -H2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
52B		CDR -H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
52C		CDR -H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
53	54	CDR -H2	E	E	E	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
54	55	CDR -H2	N	D	D	N	N	N	N	N	D	D	D	N	N	N
55	56	CDR -H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
56	57	CDR -H2	D	E	E	N	D	D	D	D	E	E	E	D	D	D
57	58	CDR -H2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR	E	I	I	K	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
		-H2														
59	60	CDR -H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR -H2	A	A	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
61	62	CDR -H2	S	E	Q	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
62	63	CDR -H2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
63	64	CDR -H2	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
64	65	CDR -H2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	CDR -H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	R	K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	M	I	M	I	I	M	M	M	M	M	M	M	M	M
70	71	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

73	74	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	T	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D	D	N	N	N	N	N	D	D	D	D	N	N
77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M	M	L	L	L	L	L	M	M	M	M	M	M
81	82	Fr3	Q	E	E	Q	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E
82	83	Fr3	F	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	R	T	T	T	T	R	R	R	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	T	A	A	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T
94	98	Fr3	T	T	G	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
95	99	<b>CDR -H3</b>	<b>S</b>	<b>-</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>									
96		<b>CDR -H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>-</b>									
97		<b>CDR -H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>-</b>									
98		<b>CDR -H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>P</b>	<b>-</b>										
99		<b>CDR -H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>M</b>	<b>-</b>										
100		<b>CDR -H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>P</b>	<b>-</b>										
100A		<b>CDR -H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>T</b>	<b>-</b>										
100B		<b>CDR -H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>A</b>	<b>-</b>										
100C		<b>CDR -H3</b>	<b>-</b>													
100D		<b>CDR</b>	<b>-</b>													

		-H3														
100E		CDR -H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100F		CDR -H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100G		CDR -H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100H		CDR -H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100I		CDR -H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100J		CDR -H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100K		CDR -H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	100	CDR -H3	N	Q	N	I	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
102	101	CDR -H3	G	H	K	Y	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
103	102	Fr4	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
105	104	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	105	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	L	L	L	T	T	T	T	L	L	L	L	L	L	L
109	108	Fr4	V	V	V	L	L	V	V	V	V	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Таблица 7

Остаток по Kabat №	Линейный остаток №	FR или CDR	VL мышиного 9F5 (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36)	Нп9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)	Нп9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)	Нп9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)	Нп9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)	Нп9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)	Нп9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)	Нп9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)	Нп9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)	Нп9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	A	S	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	A	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	F	L	L	F	F	F	F	F	F	F	L	F	F
10	10	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	N	L	L	N	N	N	N	L	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	L	P	P	L	L	P	P	P	P	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	T	E	E	T	T	T	E	E	E	E	E	E	E
18	18	Fr1	S	P	P	S	S	S	S	S	S	S	P	S	S
19	19	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
24	24	CD R- L1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
25	25	CD R- L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	CD R- L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	27	CD R- L1	K	Q	Q	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
27 A	28	CD R- L1	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27B	29	CD R- L1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
27 C	30	CD R- L1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
		L1													
27 D	31	CD R- L1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
27E	32	CD R- L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27F		CD R- L1	-	-		-	-	-	-	-	-	-			
28	33	CD R- L1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29	34	CD R- L1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
30	35	CD R- L1	I	Y	Y	I	I	I	I	I	Y	Y	I	I	I
31	36	CD R- L1	T	N	N	T	T	T	T	T	T	T	N	T	T

32	37	CD R- L1	Y	Y	Y	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CD R- L1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
34	39	CD R- L1	Y	D	D	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
37	42	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CD R- L2	Q	L	L	R	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
51	56	CD R- L2	M	G	G	V	M	M	M	G	G	G	G	M	M
52	57	CD R- L2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
53	58	CD R- L2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
54	59	CD R- L2	L	R	R	L	L	L	L	R	R	R	R	L	L
55	60	CD R- L2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
56	61	CD	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

		<b>R-L2</b>													
57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	N	N	N	N	N	N	N	D	N	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	S	G	G	G	S	S	G	G	G	G	G	S	S
65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	E	G	G	G	G	G	E	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	R	K	K	R	R	R	R	R	R	R	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
89	94	<b>CD R-L3</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>A</b>									
90	95	<b>CD R-L3</b>	<b>Q</b>												
91	96	<b>CD R-</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>N</b>								

		L3													
92	97	CD R- L3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
93	98	CD R- L3	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
94	99	CD R- L3	L	T	T	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
95	100	CD R- L3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
95 A		CD R- L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
95B		CD R- L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
95 C		CD R- L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
95 D		CD R- L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
95E		CD R- L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
95F		CD R- L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
96	101	CD R- L3	L	Y	L	Y	L	L	L	L	L	L	L	L	L
97	102	CD R- L3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	A	Q	G	G	G	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	L	V	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	L	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
106 A		Fr4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
107	112	Fr4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Таблица 8. Обратные мутации V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> и другие мутации для гуманизованного 9F5

Вариант V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Последовательность акцептора экзона V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Изменения акцепторных каркасных остатков (или CDR) (на основе композитных определений CDR по Kabat/Chothia)
Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	Номер доступа в GenBank AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32)	Отсутствует
Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	Номер доступа в GenBank AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H17, H20, H69, H75, H93, H94, H109
Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	Номер доступа в GenBank AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H17, H20, H66, H69, H75, H81, H93, H94, H109
Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	Номер доступа в GenBank AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H17, H20, H23, H28, H66, H69, H75, H81, H83, H93, H94, H109

Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	Номер доступа в GenBank AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H17, H20, H23, H28, H43, H51, H54, H56, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H109, H109
Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	Номер доступа в GenBank AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H17, H20, H23, H28, H40, H43, H48, H51, H54, H56, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	Номер доступа в GenBank AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H40, H42, H43, H51, H54, H56, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	Номер доступа в GenBank AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H40, H42, H43, H51, H66, H69, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	Номер доступа в GenBank AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H69, H75, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)	Номер доступа в GenBank AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H5, H11, H12, H17, H20, H23, H43, H66, H69, H75, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109;

Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)	Номер доступа в GenBank CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) Номер доступа в GenBank 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT № IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L64, L66
Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)	Номер доступа в GenBank CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) Номер доступа в GenBank 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT № IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	I.7, I.8, I.15, I.64, I.66, I.100
Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)	Номер доступа в GenBank CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) Номер доступа в GenBank 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT № IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7, L8, L15, L17, L66, L100
Hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)	Номер доступа в GenBank CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) Номер доступа в GenBank 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT № IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7, L8, L11, L15, L17, L51, L54, L66, L100
Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)	Номер доступа в GenBank CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) Номер доступа в GenBank 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT № IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7, L8, L11, L15, L17, L30, L51, L54, L66, L100
Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)	Номер доступа в GenBank CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) Номер доступа в GenBank 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT № IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7, L8, L11, L15, L17, L30, L51, L54, L100

Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)	Номер доступа в GenBank CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) Номер доступа в GenBank 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT № IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7, L8, L9, L11, L15, L17, L18, L31, L39, L51, L54, L60, L66, L74, L100
Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)	Номер доступа в GenBank CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) Номер доступа в GenBank 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT № IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7, L8, L11, L15, L17, L39, L64, L66, L74, L100
Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)	Номер доступа в GenBank CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) Номер доступа в GenBank 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT № IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7, L8, L11, L15, L17, L39, L60, L64, L66, L74, L100

Таблица 9. Нумерация по Kabat каркасных остатков (или CDR) (на основе CDR согласно композитному определению Kabat/Chothia) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 9F5

Остаток	AAI16432-VH_huFwvk (SEQ ID NO:31)	2RCS-VH_huFwvk (SEQ ID NO:32)	IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	VH мышинного 9F5 (SEQ ID NO:7)	Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)
H1	E	Q	E	E	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E
H5	V	Q	V	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	V	V	V	V
H11	V	L	V	L	L	L	L	L	L	L	V	V	V	V
H12	K	V	K	V	V	V	V	V	V	V	K	K	K	K
H17	S	S	T	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H20	V	L	I	L	L	I	I	I	I	I	I	I	I	I
H23	K	T	K	T	T	T	T	K	K	K	K	K	K	K
H28	T	N	T	N	N	N	N	T	T	T	N	N	N	N
H38	R	K	Q	K	K	K	K	K	K	K	R	R	Q	K
H40	A	R	A	R	R	R	R	R	R	A	A	A	R	R
H42	G	E	G	E	E	E	E	E	E	E	G	G	G	E
H43	K	Q	K	R	Q	Q	Q	Q	K	K	K	K	K	K
H48	M	I	M	I	I	I	I	I	I	M	I	I	I	I
H51	F	I	V	I	I	I	I	I	V	V	V	V	I	I
H54	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D	N	N	N
H56	E	N	E	D	D	D	D	D	E	E	E	D	D	D
H66	R	K	R	K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	R
H69	M	I	I	M	I	M	M	M	M	M	M	M	M	M
H75	T	S	T	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H76	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D	D	N	N
H80	M	L	M	L	L	L	L	L	M	M	M	M	M	M
H81	E	Q	E	Q	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E
H83	R	T	R	T	T	T	T	R	R	R	R	R	R	R
H93	A	A	A	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H94	G	S	T	T	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H108	L	T	L	L	T	T	T	T	L	L	L	L	L	L
H109	V	L	V	V	L	V	V	V	V	V	V	V	V	V

Таблица 10. Нумерация по Kabat каркасных остатков  
(на основе CDR согласно композитному определению Kabat/Chothia) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 9F5

Остаток	CAB51297-VL_huF <sub>rwk</sub> (SEQ ID NO:35)	1911357B-VL_huF <sub>rwk</sub> (SEQ ID NO:36)	IGKV228*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	VL мышного 9F5 (SEQ ID NO:11)	Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)	Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)	Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)	Hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)	Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)	Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)	Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)	Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)	Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)
L7	S	A	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S
L8	P	A	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P
L9	L	F	L	F	F	F	F	F	F	F	L	F	F
L11	L	N	L	N	N	N	N	L	L	L	L	L	L
L15	P	L	P	L	L	P	P	P	P	P	P	P	P
L17	E	T	E	T	T	T	E	E	E	E	E	E	E
L18	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	P	S	S
L30	Y	I	Y	I	I	I	I	I	Y	Y	I	I	I
L31	N	T	N	T	T	T	T	T	T	T	N	T	T
L39	K	R	K	K	R	R	R	R	R	R	K	K	K
L51	G	V	G	M	M	M	M	G	G	G	G	M	M
L54	R	L	R	L	L	L	L	R	R	R	R	L	L
L60	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D	N	D
L64	G	G	G	S	S	S	G	G	G	G	G	S	S
L66	G	E	G	G	G	G	G	G	G	E	G	G	G
L74	K	R	K	R	R	R	R	R	R	R	K	K	K
L100	G	G	Q	A	G	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q

Таблица 11. Процентный показатель степени гуманизации тяжелых и легких цепей гуманизированных антител 9F5

Вариант V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Степень
Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	66,3%
Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	69,4%
Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	71,4%
Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	74,5%
Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	80,6%
Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	82,7%
Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	84,7%
Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	82,7%
Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	80,6%
Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)	78,6%
Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)	78,0%
Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)	81,0%
Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)	83,0%
Hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)	86,0%
Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)	87,0%
Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)	86,0%
Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)	92,0%
Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)	85%
Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)	86%

Положения, в которых канонические, верньерные или интерфейсные остатки различаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами на замену. Примеры взаимодействующих канонических остатков/остатков CDR включают остатки по Kabat H54 и H94 в табл. 6. Примеры верньерных остатков включают остатки по Kabat H28, H48, H69, H93 и H94 в табл. 6 и L64 и L66 в табл. 7. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остаток по Kabat H93 в табл. 6.

Обоснования выбора положений, указанных в табл. 6, в вариабельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов на замену являются следующими:

вариабельные области тяжелой цепи hu9F5VHv1;

состоит из петель CDR-H1, H2 и H3 9F5-VH, привитых на каркас AAN16432VH и RCS-VH; hu9F5VHv2;

возвращает все каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье, или локализируются на интерфейсе доменов VH/VL или способствуют структурной стабильности. hu9F5VHv2 включает обратные мутации или замены в различных положениях, перечисленных ниже, что позволяет оценить вклад этих положений в антигенсвязывающую аффинность и иммуногенность.

hu9F5VHv3, hu9F5VHv4, hu9F5VHv5, hu9F5VHv6, hu9F5VHv7, hu9F5VHv8, hu9F5VHv9 и hu9F5VHv10,

состоит из дополнительных замен и либо для повышения стабильности Ab и/или оптимизации дезаминирования, окисления, N-гликозилирования, протеолиза и агрегации;

Q1E: представляет собой мутацию, повышающую стабильность, для уменьшения потенциала образования пироглутамата и снижения гетерогенности N-конца (Liu, выше).

Q5V: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Val находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

L11V: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Val находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

V12K: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Lys находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

S17T: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Thr находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении. Замена Thr может по-

высить стабильность по сравнению с Ser в этом положении.

L20I: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Не находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

T23K: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию. Lys находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

N28T: Это замена остатка CDR-H1 на Thr и мутация, выравнивающая зародышевую линию. Thr находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

K38R: Arg находится в AAN16432-VH\_huFrwk (SEQ ID NO: 31) в этом положении и может повысить стабильность по сравнению с Lys в этом положении.

K38Q: K38Q представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Gln находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении. Эта замена делает антитело более подобным человеческой последовательности и одновременно сохраняет функцию анти-тела.

R40A: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию. Ala находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

E42G: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Gly находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

Q43K: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию. Lys находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении. Lys в этом положении может повышать стабильность.

I48M: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию остатка в зоне Вернье. Met находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

I51V: Это замена остатка CDR-H2 на Val. Предполагается, что это положение является неантигенным контактным положением в соответствии с моделью гомологии.

Это мутация, выравнивающая зародышевую линию. Val находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

N54D и D56E: Это замены остатков CDR-H2 и предполагается, что они являются неантигенными контактными положениями в соответствии с моделью гомологии. Предполагается, что замены N54D и D56E стабилизируют структуру антитела.

K66R: Предполагается, что Arg в этом положении образует H-связи с Ser 82a и Thr 83 в дополнение к образованию H-связи и солевого мостика с Asp 86.

I69M представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье.

S75T: Предполагается, что Ser в этом положении образует H-связь с Asp 72 и Tyr 76. Предполагается, что Thr в этом положении также осуществляет такие контакты, но являясь доступным на поверхности остатком Thr может повышать стабильность антитела. S75T представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Thr находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении. Thr находится в акцепторной последовательности AAN16432-VH\_huFrwk в этом положении.

N76D: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Asp находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении. Asp в этом положении может снижать потенциал N-гликозилирования.

L80M: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Met находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

Q81E: Предполагается, что Glu образует H-связь плюс солевой мостик с Lys19, следовательно, Glu в этом положении повышает стабильность антитела.

T83R: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию. Arg находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

A93T: Положение H93 представляет собой остаток интерфейса тяжелой цепи/легкой цепи. Обратная мутация к мышинному остатку Thr в этом положении сохраняет этот интерфейс. A93T также представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Thr находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении. A93T в этом положении делает антитело более подобным человеческому антителу.

S94T: представляет собой обратную мутацию канонического структурного остатка и верньерного остатка согласно определению по Chothia. S94T также представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Thr находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

T108L: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Leu находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

L109V: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию. Val наиболее часто встречается в этом положении. Val находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

Обоснования выбора положений, указанных в табл. 7, в вариабельной области легкой цепи в качестве кандидатов на замену являются следующими:

вариабельные области легкой каппа-цепи

hu9F5VLv1

состоит из петель CDR-L1, L2 и L3 9F5-VL, привитых к каркасу VL CAB51297 и VL 1911357B наряду с возвратом всех каркасных замен в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье или расположены на интерфейсе доменов VH/VL.

hu9F5VLv2, hu9F5VLv3, hu9F5VLv4, hu9F5VLv5, hu9F5VLv6, hu9F5VLv7, hu9F5VLv8 и hu9F5VLv9 также включают замены, которые способствуют структурной стабильности антигенсвязывающей аффинности и иммуногенности. Ниже перечислены замены, сделанные в этих вариантах.

A7S: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Ser находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении. Замена Ser может повышать стабильность, так как боковая цепь Ser образует H-связь с основной цепью Phe9, делая петлю более стабильной.

A8P: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию. Pro находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

F9L: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Leu находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

N11L: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию. Leu находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

L15P: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию. Pro находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении. Pro в этом положении может лучше подойти для поддержки изгиба белка в этом положении.

T17E: представляет собой частотную мутацию. Glu часто встречается в этом положении, и предполагается, что Glu в этом положении образует H-связь с T14 и солевой мостик с Lys 107, оба остатка легкой цепи, и повышает стабильность антитела.

S18P: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Pro находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

I30Y: Это замена остатка CDR-L1, предположительно находящегося в зоне контакта с антигеном. Тут в этом положении образует стэкинг с Тут32 и His27D, повышая тем самым стабильность. Поскольку Ile и Тут являются гидрофобными, замена Тут может быть хорошо переносимой.

T31N: Это замена остатка CDR-L1. Asn в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

R39K: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Lys находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении. Lys может обеспечивать структурную поддержку, эквивалентную Arg.

M51G: Это замена остатка CDR-L2, и предполагается, что он направлен в противоположную сторону от интерфейса антигена. Gly также представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Gly находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

Предполагается, что данное положение является доступным на поверхности. Gly в этом положении, будучи нейтральным, снижает потенциал окисления Met.

L54R: Это замена остатка CDR-L2, и предполагается, что он направлен в противоположную сторону от интерфейса антигена. Arg также представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Arg в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении. Предполагается, что Arg образует H-связи с цепями Asn60 и Phe62, повышая стабильность межцепочечной петли.

N60D: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Asp находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

G64S представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье. Обратная мутация G64S сохраняет конформацию CDR.

E66G представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье. Обратная мутация E66G сохраняет конформацию CDR. E66G представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Gly находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

R74K: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Lys находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

G100Q: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию. Gln находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении. Предполагается, что данный остаток является доступным на поверхности, и поэтому Gln в этом положении может быть лучше для растворимости антитела, поскольку он является гидрофильно нейтраль-

ным. Gln в этом положении может усиливать стабильность.

На основе этих человеческих каркасов были разработаны следующие варианты: переменные области тяжелой цепи

> hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
TEYASKFQGKATITADTSSNTAYLQSSLTSEDTAVYYCASSNGWGQGTTLTVSS

> hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGKATMTADTSTNTAYLQSSLTSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

> hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLESSLTSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

> hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

> hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEKLEWIGWVDPEDGET  
EYASKFQGRATMTADTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTLTVTVSS

> hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQAPEKLEWIMGWVDPEDGE  
TEYASKFQGRATMTADTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTLTVTVSS

> hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVRQAPGKLEWIGWVDPEDGE  
TEYASKFQGRATMTADTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTLTVTVSS

> hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVRQAPGKLEWIGWVDPENGDT  
TEYASKFQGRATMTADTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTLTVTVSS

> hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQRPQKLEWIGWIDPENGDT  
TEYASKFQGRATMTADTSTNTAYMESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTLTVTVSS

> hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128), (также известное как hu9F5VHv9\_Q38K\_G42E)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVKQRPEKLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYMESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTLTVTVSS

переменные области легкой каппа-цепи

> hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLA  
SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKLEIK

> hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)

DIVMTQSPFNSNPVTPGTSASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)

DIVMTQSPFNSNPVTPGESASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)

DIVMTQSPFSLPVTGEPASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)

DIVMTQSPFSLPVTGEPASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)

DIVMTQSPFSLPVTGEPASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSGSESGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)

DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSKLLHSNGINLYWYLQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)

DIVMTQSPFSLPVTGEPASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131), также известное как hu9F5VLv8\_N60D

DIVMTQSPFSLPVTGEPASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

Гуманизированные последовательности генерируют с использованием протокола двухэтапной ПЦР, который позволяет вводить множественные мутации, делеции и вставки с использованием сайт-направленного мутагенеза QuikChange [Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) BioTechniques 26:680-682].

Пример 5. Иммуногенность hu9F5VHv4/hu9F5VLv2

Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 18) и варибельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 24) hu9F5VHv4/hu9F5VLv2 анализировали с использованием инструмента деиммунизации iedb.org (Dhanda et al, Immunology. 2018 Jan;153(1):118-132). В табл. 12 показаны пептиды, которые могут быть выбраны для деиммунизации hu9F5VLv2, т.е. указаны области, в которых могут быть сделаны дополнительные замены для снижения потенциальной иммуногенности.

Таблица 12. Результаты анализа иммуногенности, определяющего потенциальные пептиды в hu9F5VLv2 для деиммунизации

Начальное положение (линейное)	Конечное положение (линейное)	Медианный процентильный ранг	Пептид
51	65	9,895	LLIYQMSNLAGVVPN
46	60	15,18	GQSPQLLIYQMSNLA
26	40	16,055	SKSLLHSNGITYLYW
76	90	18,23	FTLRISRVEAEDVGV
36	50	19,455	TYLYWYLQRPQSPQ
86	100	19,535	EDVGVYYCAQNLELP

На основании результатов анализа, представленных в табл. 12, были сконструированы варианты варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2, нацеленные на аминокислотные остатки, выделенные жирным шрифтом в табл. 13. Каждый вариант включает одну из следующих аминокислотных замен, как показано в табл. 14.

Таблица 13. Аминокислотные остатки, намеченные для замены

Целевые остатки варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2	Оригинальный SEQ ID NO
DIVMTQSPFSPNPVTPGTSASISCRSSK <b>SLL</b> HSNG <b>I</b> TYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLA SGV <b>P</b> NR <b>F</b> SSSGSGTDF <b>T</b> LRISRVEAEDVGV <b>Y</b> YCAQNLELPLTFGQGTKLEIK	24

Таблица 14. Аминокислотные замены, сделанные в варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 для снижения иммуногенности

Линейный номер	Номер по Kabat	SEQ ID NO полученной варибельной области легкой цепи
M56E	M51E	SEQ ID NO:61
M56D	M51D	SEQ ID NO:62
L30D	L27cD	SEQ ID NO:63
L30G	L27cG	SEQ ID NO:64
L30S	L27cS	SEQ ID NO:65
L30E	L27cE	SEQ ID NO:66
I35E	I30E	SEQ ID NO:67
I35K	I30K	SEQ ID NO:68
L30T	L27cT	SEQ ID NO:69
L30N	L27cN	SEQ ID NO:70
L29D	L27bD	SEQ ID NO:71
I35G	I30G	SEQ ID NO:72

L38N	L33N	SEQ ID NO:73
L30A	L27cA	SEQ ID NO:74
L38T	L33T	SEQ ID NO:75
L38S	L33S	SEQ ID NO:76
L38R	L33R	SEQ ID NO:77
I35Q	I30Q	SEQ ID NO:78
L29T	L27bT	SEQ ID NO:79
T36G	T31G	SEQ ID NO:80
L29Q	L27bQ	SEQ ID NO:81
L38G	L33G	SEQ ID NO:82
L30P	L27cP	SEQ ID NO:83
V83R	V78R	SEQ ID NO:84
I80D	I75D	SEQ ID NO:85
V83D	V78D	SEQ ID NO:86
V83E	V78E	SEQ ID NO:87
V83P	V78P	SEQ ID NO:88
V83K	V78K	SEQ ID NO:89
R82D	R77D	SEQ ID NO:90
V83G	V78G	SEQ ID NO:91
S81P	S76P	SEQ ID NO:92
I80P	I75P	SEQ ID NO:93
I80Q	I75Q	SEQ ID NO:94
I80G	I75G	SEQ ID NO:95
L78P	L73P	SEQ ID NO:96
L78G	L73G	SEQ ID NO:97
V83Q	V78Q	SEQ ID NO:98
S81G	S76G	SEQ ID NO:99
L97D	L92D	SEQ ID NO:100
Y91T	Y86T	SEQ ID NO:101
L97E	L92E	SEQ ID NO:102
L97G	L92G	SEQ ID NO:103
L97Q	L92Q	SEQ ID NO:104
L99G	L93G	SEQ ID NO:105
V90G	V85G	SEQ ID NO:106
L97T	L92T	SEQ ID NO:107
A94G	A89G	SEQ ID NO:108

Аналогично, hu9F5VHv4 был проанализирован на потенциальную иммуногенность, и в табл. 15 показан пептид, выявленный для потенциальной деиммунизации.

Таблица 15. Результаты анализа иммуногенности, определяющего потенциальные пептиды в hu9F5VHv4 для деиммунизации

Начальное положение (линейное)	Конечное положение (линейное)	Медианный процентильный ранг	Пептид
76	90	11,925	TNTAYLESSLRSED

На основе этих результатов были сконструированы варианты вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 и вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv5, нацеленные на аминокислотные остатки, выделенные жирным шрифтом в табл. 16. Каждый вариант включает одну из следующих аминокислотных замен, как показано в табл. 17.

Таблица 16. Аминокислотные остатки, намеченные для замены.

Целевые остатки вариабельной области тяжелой цепи	Оригинальный SEQ ID NO
hu9F5VHv4	18
EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIK DDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTTEY ASKFQGRATMTADTSTNTAYLESSLRSED TAVYYCTTNGWGQGTTVTVSS	
hu9F5VHv5	19
EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIK DDYMNWVKQRPEKLEWIGWVDPEDGETEY ASKFQGRATMTADTSTDATYMESSLRSED TAVYYCTTNGWGQGLTVTVSS	

Таблица 17. Аминокислотные замены, сделанные в вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 или v5, как указано, для снижения иммуногенности

Линейный номер	Номер по Kabat	Вариант 9F5, в котором сделаны замены	SEQ ID NO полученной вариабельной области тяжелой цепи
L81P	L80P	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:109
L81D	L80D	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:110
L86G	L82cG	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:111
L86D	L82cD	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:112
L83P	L82P	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:113
L81G	L80G	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:114
L83K	L82K	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:115
L83R	L82R	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:116
L83E	L82E	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:117
L83N	L82N	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:118
Y80D	Y79D	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:119
Y80N	Y79N	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:120
Y80G	Y79G	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:121

M81E	M80E	hu9F5VHv5	SEQ ID NO:122
M81G	M80G	hu9F5VHv5	SEQ ID NO:123
L86S	L82cS	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:124
Y80Q	Y79Q	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:125
S84G	S82aG	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:126

Пример 6. Иммуногенность hu9F5VLv8 и hu9F5VHv10

Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 128) и варибельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 130) hu9F5VHv10/hu9F5VLv8 анализировали с использованием инструмента деиммунизации iedb.org (Dhanda et al, Immunology. 2018 Jan;153(1):118-132). В табл. 18 показаны пептиды, которые могут быть выбраны для деиммунизации hu9F5VLv8, т.е. указаны области, в которых могут быть сделаны дополнительные замены для снижения потенциальной иммуногенности.

Таблица 18. Результаты анализа иммуногенности, определяющего потенциальные пептиды в hu9F5VLv8 для деиммунизации

Начальное положение (линейное)	Конечное положение (линейное)	Медианный процентильный ранг	Пептид
51	65	9,895	LLIQMSNLASGVPN
46	60	15,18	GQSPQLLIQMSNLA
26	40	16,055	SKSLLHSNGITYLYW
1	15	17,995	DIVMTQSPFSLPVTTP
86	100	19,535	EDVGVYYCAQNLELP
36	50	19,84	TYLYWYLQKPGQSPQ

На основании результатов анализа, представленных в табл. 19, были сконструированы варианты варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8, нацеленные на аминокислотные остатки, выделенные жирным шрифтом в табл. 19. Каждый вариант включает одну или более аминокислотных замен в остатках, выделенных жирным шрифтом в табл. 19, как показано в табл. 20-21. Hu9F5VLv8 с заменой N60D также известен как hu9F5VLv9.

Таблица 19. Аминокислотные остатки, намеченные для замены

Целевые остатки варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8	SEQ ID NO: hu9F5VLv8
DIVMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLL HSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIQMSNLA SGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK	130

Таблица 20. Аминокислотные замены, сделанные в вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv8 для снижения иммуногенности

Название варианта	Замены в дополнительных вариантах в hu9F5VLv8, предназначенные для снижения иммуногенности (указан номер мутации(-ий) по Kabat)	SEQ ID NO полученной вариабельной области легкой цепи
hu9F5VLv8_DIM1	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54G, L92I	SEQ ID NO:132
hu9F5VLv8_DIM2	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, L92I	SEQ ID NO:133
hu9F5VLv8_DIM3	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54T, L92I	SEQ ID NO:134
hu9F5VLv8_DIM4	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, L92G	SEQ ID NO:135
hu9F5VLv8_DIM5	V3Q, L27cG, L37Q, M51G, L54R, L92I	SEQ ID NO:136
hu9F5VLv8_DIM6	V3Q, L27cD, L37Q, M51G, L54R, L92I	SEQ ID NO:137
hu9F5VLv8_DIM7	V3Q, L27cD, L37Q, M51K, L54R, L92I	SEQ ID NO:138
hu9F5VLv8_DIM8	V3Q, L27cG, L37Q, M51K, L54R, L92I	SEQ ID NO:139
hu9F5VLv8_DIM9	V3Q, L27cG, L37Q, M51K, L54G, L92I	SEQ ID NO:140
hu9F5VLv8_DIM10	V3Q, L27cS, L37Q, M51K, L54G, L92I	SEQ ID NO:141
hu9F5VLv8_DIM11	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, L92I	SEQ ID NO:142
hu9F5VLv8_DIM12	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, L92G	SEQ ID NO:143
hu9F5VLv8_DIM13	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R	SEQ ID NO:144
hu9F5VLv8_DIM14	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54T, L92I	SEQ ID NO:145
hu9F5VLv8_DIM15	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54T, L92G	SEQ ID NO:146
hu9F5VLv8_DIM16	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54T	SEQ ID NO:147
hu9F5VLv8_DIM17	V3Q, L27cS, L37G, M51G, L54T, L92I	SEQ ID NO:148
hu9F5VLv8_DIM18	V3Q, L27cD, L37G, M51G, L54R, L92I	SEQ ID NO:149
hu9F5VLv8_DIM19	V3Q, L27cS, L37I, M51I, L54R, L92I	SEQ ID NO:150
hu9F5VLv8_DIM20	V3Q, L27cS, L37Q, M51I, L54G, L92I	SEQ ID NO:151
hu9F5VLv8_DIM21	V3Q, L27cS, L37Q, M51I, L54G	SEQ ID NO:152
hu9F5VLv8_DIM22	V3Q, L27cS, L37Q, M51E, L54R, L92I	SEQ ID NO:153
hu9F5VLv8_DIM23	V3Q, L27cG, L37Q, M51E, L54G, L92I	SEQ ID NO:154
hu9F5VLv8_DIM24	V3Q, L27cG, L37I, M51E, L54R, L92I	SEQ ID NO:155
hu9F5VLv8_DIM25	V3Q, L27cG, L37I, M51E, L54R, L92G	SEQ ID NO:156
hu9F5VLv8_DIM26	V3Q, L27cI, L37I, M51E, L54R	SEQ ID NO:157
hu9F5VLv8_DIM27	V3Q, L37Q, M51G, L54R, L92I	SEQ ID NO:158
hu9F5VLv8_DIM28	V3Q, L27cS, M51G, L54R, L92I	SEQ ID NO:159
hu9F5VLv8_DIM29	V3Q, L27cS, L37Q, L54R, L92I	SEQ ID NO:160
hu9F5VLv8_DIM30	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L92I	SEQ ID NO:161

Таблица 21. Аминокислотные замены, сделанные в вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv9 для снижения иммуногенности

Название варианта	Замены в дополнительных вариантах в hu9F5VLv9, предназначенные для снижения иммуногенности (указан номер мутации(-ий) по Kabat)	SEQ ID NO полученной вариабельной области легкой цепи
hu9F5VLv9_DIM1	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54G, L92I	SEQ ID NO:162
hu9F5VLv9_DIM2	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, L92I	SEQ ID NO:163
hu9F5VLv9_DIM4	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, L92G	SEQ ID NO:164
hu9F5VLv9_DIM5	V3Q, L27cG, L37Q, M51G, L54R, L92I	SEQ ID NO:165
hu9F5VLv9_DIM8	V3Q, L27cG, L37Q, M51K, L54R, L92I	SEQ ID NO:166
hu9F5VLv9_DIM10	V3Q, L27cS, L37Q, M51K, L54G, L92I	SEQ ID NO:167
hu9F5VLv9_DIM11	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, L92I	SEQ ID NO:168
hu9F5VLv9_DIM13	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R	SEQ ID NO:169
hu9F5VLv9_DIM19	V3Q, L27cS, L37I, M51I, L54R, L92I	SEQ ID NO:170
hu9F5VLv9_DIM20	V3Q, L27cS, L37Q, M51I, L54G, L92I	SEQ ID NO:171

Обоснования выбора положений, указанных в табл. 20 и табл. 21, в вариабельной области легкой

цепи в качестве кандидатов на замену являются следующими.

Мутация в V3Q была разработана на основе рекомендаций по результатам анализа деиммунизации. Gln в положении 3 является вторым по частоте в этом положении в человеческой последовательности, поэтому замена V3Q призвана снизить иммуногенность и сохранить последовательность более подобной человеческой последовательности. Прогноз иммуногенности в отношении замен hu9F5VLv8\_V3Q показывает элиминацию N-концевого пептида 1-15.

Следующие мутации были разработаны на основе рекомендаций по результатам анализа деиммунизации, а также с учетом положения данного остатка в модели гомологии. Мутации также были разработаны для сохранения функциональности антитела за счет сохранения размера и заряда/полярности замещенного остатка. Приоритет отдавался остатку, если он совпадал с остатком в зародышевой линии человека.

L27cI, L27cS, L27cD, L27cG: для снижения иммуногенности L37Q, L37G, L37I: для снижения иммуногенности M51G, M51K, M51I, M51E: для снижения иммуногенности M51G: Это замена остатка CDR-L2, и предполагается, что он направлен в противоположную сторону от интерфейса антигена. Gly также представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Gly находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении. Предполагается, что данное положение является доступным на поверхности. Gly в этом положении, будучи нейтральным, снижает потенциал окисления Met.

L54G, L54R, L54T: для снижения иммуногенности

L54R: Это замена остатка CDR-L2, и предполагается, что он направлен в противоположную сторону от интерфейса антигена. Arg также представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Arg в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении. Предполагается, что Arg образует H-связи с цепями Asn60 и Phe62, повышая стабильность межцепочечной петли.

N60D: для снижения иммуногенности. N60D: также представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Asp находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

L92I, L92G: для снижения иммуногенности

Таблица 22. Результаты анализа иммуногенности, определяющего потенциальные пептиды в hu9F5VHv10 для деиммунизации

Начальное положение (линейное)	Конечное положение (линейное)	Медианный процентильный ранг	Пептид
76	90	12,72	TNTAYMELSSLRSED

В табл. 22 показаны пептиды, которые могут быть выбраны для деиммунизации hu9F5VHv10, т.е. указаны области, в которых могут быть сделаны дополнительные замены для снижения потенциальной иммуногенности.

На основании этих результатов был сконструирован вариант варибельной области тяжелой цепи hu9F5VHv10, нацеленный на аминокислотный остаток H82c, выделенный жирным шрифтом в табл. 23. Вариант hu9F5VHv10\_L82cG включает замену L82cG, как показано в табл. 24.

Таблица 23. Аминокислотные остатки, намеченные для замены

Целевые остатки варибельной области тяжелой цепи	Оригинальный SEQ ID NO
>hu9F5VHv10 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVKQRPE KGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAYMELSS LRSEDTAVYYCTTNGWGQGLVTVSS	128

Таблица 24. Аминокислотные замены, сделанные в варибельной области тяжелой цепи hu9F5VHv10 для снижения иммуногенности

Название варианта	Замены в дополнительных вариантах в hu9F5VHv10, предназначенные для снижения иммуногенности (указан номер мутации(-ий) по Kabat)	SEQ ID NO полученной варибельной области тяжелой цепи
hu9F5VHv10_L82cG	L82cG	SEQ ID NO: 129

## Пример 7. Анализ вариантов гуманизированного 9F5

Гуманизированные варианты 9F5 со спрогнозированными деиммунизирующими заменами анализировали по нескольким характеристикам, включая аффинность связывания с мишенью, активность в клеточных анализах, термостабильность, характеристики экспрессии и количество замен. Во всех случаях результаты сравнивали с исходной последовательностью hu9F5VHv9/hu9F5VLv8, чтобы определить, отмечалась ли потеря активности или стабильности.

Анализ связывания мишени проводили с использованием Biacore T200 для сравнения аффинности связывания гуманизированных вариантов 9F5 с рекомбинантным тау 4R0N человека. Антитело против Fc человека иммобилизовали на сенсорном чипе CM3 посредством аминного связывания, и гуманизированные варианты 9F5 были захвачены до эквивалентных уровней. Различные концентрации рекомбинантного тау 4R0N человека (в диапазоне от 0,02 до 12,5 нМ) пропускали через захваченный лиганд со скоростью 50 мкл/мин в рабочем буфере (HBS + 0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в течение 180 с ассоциации/420 с диссоциации в качестве одного цикла. Из данных были вычтены значения холостой пробы для нерелевантного датчика, не содержащего антитела, и концентрации аналита 0 нМ. Анализ был проведен с использованием общей подгонки 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore Evaluation.

Определение аффинности выявило ряд деиммунизированных вариантов, которые сохранили аффинность родительских антител, что было определено путем сравнения  $K_D$  каждого антитела. В данном случае,  $K_D$  антител были определены как сопоставимые в пределах 3-кратного уровня с hu9F5VHv9/hu9F5VLv8 (табл. 25), включают

hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM2,	hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM5,
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM6,	hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM7,
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM8,	hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM11,
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM12,	hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM13,
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM14,	hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM17,
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM18,	hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM27,
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM28,	hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM29,
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM30 и hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM11.	

Таблица 25. Аффинность гуманизированных вариантов 9F5

Гуманизированный вариант 9F5 и SEQ ID NO:	Замены в VH относительно hu9F5VHv9 (номер мутации(-ий) по Kabat)	Замены в VL относительно hu9F5VLv8 (номер мутации(-ий) по Kabat)	$K_a$ (1/М с)	$K_d$ (1/с)	$K_D$ (М)
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:130			1716666,6 67	0,0004293 33	2.69333 E-10
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM1 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:132		V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54G, L92I	6620000	0,00559	8.44E-10
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM2 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:133		V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, L92I	1960000	0,000586	2.99E-10

## 047155

hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM3 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:134	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54T, L92I	1130000	0,00068	6E-10
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM4 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:135	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, L92G	542000	0,00143	2.63E-09
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM5 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:136	V3Q, L27cG, L37Q, M51G, L54R, L92I	1750000	0,000295	1.69E-10
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM6 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:137	V3Q, L27cD, L37Q, M51G, L54R, L92I	1530000	0,000272	1.78E-10
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM7 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:138	V3Q, L27cD, L37Q, M51K, L54R, L92I	2360000	0,000424	1.8E-10
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM8 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:139	V3Q, L27cG, L37Q, M51K, L54R, L92I	1320000	0,000576	4.35E-10
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM9 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:140	V3Q, L27cG, L37Q, M51K, L54G, L92I	2290000	0,0116	5.07E-09
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM10 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:141	V3Q, L27cS, L37Q, M51K, L54G, L92I	18900000	0,0741	3.92E-09
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM11 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:142	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, L92I	1420000	0,00011	7.72E-11
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM12 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:143	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, L92G	1940000	0,000429	2.21E-10
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM13 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:144	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R	1650000	0,000439	2.66E-10
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM14 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:145	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54T, L92I	1330000	0,000188	1.42E-10

## 047155

hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM15 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:146	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54T, L92G	839000	0,000732	8.73E-10
hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM16 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:147	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54T	2270000	0,000808	3.55E-10
hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM17 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:148	V3Q, L27cS, L37G, M51G, L54T, L92I	2540000	0,000326	1.28E-10
hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM18 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:149	V3Q, L27cD, L37G, M51G, L54R, L92I	2100000	0,0000939	4.47E-11
hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM19 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:150	V3Q, L27cS, L37I, M51I, L54R, L92I	3610000	0,00215	5.97E-10
hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM20 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:151	V3Q, L27cS, L37Q, M51I, L54G, L92I	5640000	0,0694	1.23E-08
hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM21 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:152	V3Q, L27cS, L37Q, M51I, L54G	1310000	1,12	0,000000 858
hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM22 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:153	V3Q, L27cS, L37Q, M51E, L54R, L92I	2250000	0,000878	3.9E-10
hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM23 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:154	V3Q, L27cG, L37Q, M51E, L54G, L92I	66900000	0,0832	1.24E-09
hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM24 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:155	V3Q, L27cG, L37I, M51E, L54R, L92I	2190000	0,000993	4.54E-10
hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM25 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:156	V3Q, L27cG, L37I, M51E, L54R, L92G	13000000	0,0409	3.15E-09
hu9F5VHv9/hu9F 5VLv8_DIM26 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:157	V3Q, L27cI, L37I, M51E, L54R	3840000	0,004	1.04E-09

## 047155

hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM27 SEQ ID NO:127 SEQ ID NO:158		V3Q, L37Q, M51G, L54R, L92I	2410000	0,000385	1.6E-10
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM28 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:159		V3Q, L27cS, M51G, L54R, L92I	3130000	0,000217	6.92E-11
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM29 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:160		V3Q, L27cS, L37Q, L54R, L92I	1980000	0,000534	2.7E-10
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM30 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:161		V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L92I	1020000	0,000447	4.38E-10
hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM1 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:162	Q38K, G42E	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54G, N60D, L92I	2690000	0,00395	1.47E-09
hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM2 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:163	Q38K, G42E	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, N60D, L92I	2720000	0,00184	6.79E-10
hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM4 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:164	Q38K, G42E	V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, N60D, L92G	2530000	0,00439	1.74E-09
hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM5 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:165	Q38K, G42E	V3Q, L27cG, L37Q, M51G, L54R, N60D, L92I	1700000	0,000919	5.42E-10
hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM8 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:166	Q38K, G42E	V3Q, L27cG, L37Q, M51K, L54R, N60D, L92I	2710000	0,00232	8.59E-10
hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM10 SEQ ID NO:/ SEQ ID NO:167	Q38K, G42E	V3Q, L27cS, L37Q, M51K, L54G, N60D, L92I	6890000	0,026	3.77E-09
hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM11 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:168	Q38K, G42E	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, N60D, L92I	1760000	0,000287	1.63E-10
hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM13 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:169	Q38K, G42E	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, N60D,	2280000	0,00116	5.08E-10

hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM19 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:170	Q38K, G42E	V3Q, L27cS, L37I, M51I, L54R, N60D, L92I	3490000	0,00688	1.97E-09
hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM20 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:171	Q38K, G42E	V3Q, L27cS, L37Q, M51I, L54G, N60D, L92I	3470000	0,0334	9.62E-09

Кроме того, в качестве вторичной характеристики были проанализированы термостабильность и титр для всех деиммунизированных вариантов. Уровни термостабильности и титра сравнивали для антител, которые были сопоставимы с Hu9F5VHv9/Hu9F5VLv8 на основании измерений аффинности, а антитела в табл. 26 перечислены в порядке, основанном на отклонении от  $T_m$  of Hu9F5VHv9/Hu9F5VLv8.

Значения термостабильности определяли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Все сканирования ДСК проводились с использованием системы VP-Capillary DSC (Malvern). Все образцы были приготовлены в концентрации 0,5 мг/мл в 1хФСБ и сравнивались с эталоном 1хФСБ. Приблизительно 0,5 мл раствора белка и буфера вводили в образец и сравнительную ячейку. Калориметрическое сканирование проводилось при скорости сканирования 60°C/ч, при температуре от 25 до 110°C при постоянном давлении. Анализ проводили с использованием программного обеспечения Origin. Сообщаемые значения представляют собой температуру, при которой регистрируется максимальная теплотемкость пика Fab.

Титр определяли следующим образом. После экспрессии в суспензионных клетках 293 антитела очищали с использованием хроматографии на основе связывания с белком А, используя стандартные методы. После очистки антитела заменяли на 1хФСБ, и концентрации белка определяли по поглощению при 280 нм. Титры рассчитывали путем деления конечного выхода очищенного белка на начальный объем экспрессионной культуры и выражали в миллиграммах на литр.

Таблица 26. Термостабильность и титр гуманизированных вариантов 9F5

Гуманизированный вариант 9F5	Замены в VH относительно hu9F5VHv9 (номер мутации(-ий) по Kabat)	Замены в VL относительно hu9F5VLv8 (номер мутации(-ий) по Kabat)	$T_m$ (°C)— отклонение пика Fab от hu9F5VHv9/hu9F5VLv8	титр (мг/л)
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:130			0	491,6
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM18 SEQ ID NO:127 / SEQ ID NO:149		V3Q, L27cD, L37G, M51G, L54R, L92I	-1,55	579,60
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM11 SEQ ID NO:127 / SEQ ID NO:142		V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, L92I	-3,06	446,40
hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM28 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:159		V3Q, L27cS, M51G, L54R, L92I	-0,27	348,70

## 047155

hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM17 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:148		V3Q, L27cS, L37G, M51G, L54T, L92I	-3,83	423,80
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM6 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:137		V3Q, L27cD, L37Q, M51G, L54R, L92I	-0,77	569,80
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM14 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:145		V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54T, L92I	-5,65	282,40
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM5 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:136		V3Q, L27cG, L37Q, M51G, L54R, L92I	-1,83	287,30
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM7 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:138		V3Q, L27cD, L37Q, M51K, L54R, L92I	-2,05	636,60
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM27 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:158		V3Q, L37Q, M51G, L54R, L92I	-0,16	351,20
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM12 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:143		V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, L92G	-6,38	369,40
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM13 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:144		V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R	-1,7	595,80
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM2 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:133		V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, L92I	-0,3	474,30
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM29 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:160		V3Q, L27cS, L37Q, L54R, L92I	-1,83	327,50
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM30 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:161		V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L92I	-0,92	372,50
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM8 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:139		V3Q, L27cG, L37Q, M51K, L54R, L92I	-4,89	451,50

hu9F5VHv10/hu9F5V Lv9_DIM11 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:168	Q38K, G42E	V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, N60D, L92I	-11,94	244,60
---	---------------	--	--------	--------

Пример 8. Нейтрализующая активность гуманизированных вариантов 9F5

Нейтрализующая активность гуманизированных вариантов 9F5 анализируется в клеточной модели интернализации тау. Для оценки способности антител блокировать интернализацию тау нейронами проводится анализ интернализации с использованием сортировки активированных флуоресценцией клеток (FACS). Антитела, которые блокируют интернализацию, скорее всего, заблокируют передачу тау. pHrodo-меченный растворимый олигомер P301L тау 4R0N человека (конечная концентрация 1,5 мкг/мл) предварительно инкубируют с антителами к тау (титрование дозы: начальная концентрация 80 мкг/мл с последующими 4-кратными серийными разведениями) в течение 30 мин при комнатной температуре в среде для культивирования клеток. Затем смесь тау/антитело добавляют к клеточным линиям нейробластомы B103 при конечной концентрации 500 000 клеток/мл и инкубируют в течение 3-4 ч при 37°C в инкубаторе для тканевых культур (5% CO<sub>2</sub>). Затем клетки промывают 3 раза культуральной средой с последующей 10-минутной инкубацией в культуральной среде и дважды промывают буфером FACS (1% ФБС в ФСБ). Клетки ресуспендируют в 100 мкл буфера FACS и при средней интенсивности флуоресценции техасским красным, измеренной с помощью FACS LSR II. Флуоресценция техасским красным pHrodo активируется низким pH, связанным с эндолізосомными компартментами при интернализации. Поскольку FACS обнаруживает клетки, а pHrodo флуоресцирует только при интернализации, будет обнаружен только тау, интернализированный клетками. Чем ниже средняя интенсивность флуоресценции, тем меньше количество интернализированного тау, что предполагает более высокую блокирующую активность тестируемого антитела.

Пример 9. Конструирование гуманизированных антител 10C12

Исходным или донорским антителом для гуманизации было мышинное антитело 10C12. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи зрелого m10C12 представлена как SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность варибельной легкой цепи зрелого m10C12 представлена как SEQ ID NO: 11. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно композитному определению по Kabat/Chothia представлены как SEQ ID NO: 8-10, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи по Kabat представлены как SEQ ID NO: 12-14, соответственно. Во всем тексте используется нумерация по Kabat.

Переменная каппа (Vk)10C12 принадлежит к мышинной подгруппе 2 по Vk, которая соответствует человеческой подгруппе 2 по Vk, а переменная тяжелой цепи (Vh) принадлежит к мышинной подгруппе 2c по Vh, которая соответствует человеческой подгруппе 1 по Vh [Kabat E. A., et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242]. CDR-L1 по Chothia 16 остатков подобна каноническому классу 4 по Chothia, CDR-L2 по Chothia 7 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia, CDR-L3 по Chothia 9 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia [Martin ACR. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. B: Kontermann R and Dübel S (eds). Antibody Engineering. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.. [Martin, 2010]. CDR-H1 по Chothia 10 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia, CDR-H2 по Chothia 17 остатков подобна каноническому классу 2 по Chothia [Martin, 2010]. CDR-H3 по Chothia 3 остатков не имеет канонических классов. Был проведен поиск последовательностей белков в базе данных PDB [Deshpande N, et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33: D233-7], чтобы найти конструкции, которые обеспечили бы приблизительную структурную модель 10C12. Кристаллическая структура fab антитела с кодом pdb 50BF [Vicentini, et al., 2017, не опубликовано] использовалась как для структуры Vh, так и для Vk, поскольку она имела хорошее разрешение (1,92Å) и общее сходство последовательностей с Vh и Vk 10C12, сохраняя те же канонические структуры для петель.

Каркасы VH 10C12 имеют высокую степень сходства с соответствующими областями варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина [Homo sapiens] CAC20421, клонированного Arnold-Schild et al [Cancer Res. 60 (15), 4175-4178 (2000)]. Варибельные домены VH 10C12 и CAC20421 также имеют одинаковую длину в отношении петель CDR-H1, H2. Аналогично, каркасы VL 10C12 имеют высокую степень сходства последовательности с соответствующими областями человеческого антитела CAB51297, клонированного Capello et al. [Identification of three subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia based upon mutations of BCL-6 and IGV genes. Неопубликовано (прямая подача в GenBank)]. Варибельный домен легкой цепи антител 10C12 и CAB51297 также имеет одинаковую длину в отношении петель CDR-L1, L2 и L3. Соответственно, каркасные области и VH CAC20421 и VL CAB51297 были выбраны в качестве акцепторных последовательностей для CDR 10C12. Модель CDR 10C12, привитых к соответствующим человеческим каркасам для VH и VL, была построена и использовалась в качестве руководства для дальнейших обратных мутаций.

Последовательности вариантов тяжелой и легкой цепей, полученные в результате процесса гумани-

зации антител, дополнительно выравнивали с последовательностями зародышевой линии человека с использованием инструмента IMGT Domain GapAlign для оценки степени гуманизации тяжелой и легкой цепей, как указано в руководящих принципах комитета ВОЗ по МНН. (WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review) (Internet) 2014. Доступно по адресу: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) Остатки были изменены для выравнивания с соответствующей последовательностью зародышевой линии человека, где это возможно, для повышения степени гуманизации и снижения потенциальной иммуногенности. Для гуманизованных вариантов VLv1 и VLv2 были введены мутации, чтобы сделать последовательности более похожими на ген зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37). Для гуманизованных вариантов VHv1 и VHv2 были введены мутации, чтобы сделать последовательности более похожими на ген зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33)

Дополнительные версии hu10C12-VH и hu10C12-VL были сконструированы для обеспечения возможности оценки различных каркасных остатков на предмет их вклада в связывание антигена, термостабильность и иммуногенность, а также для оптимизации дезаминирования, окисления, N-гликозилирования, протеолиза и агрегации. Положения, рассматриваемые для мутации, включают те, которые

определяют канонические конформации CDR (обобщено в Martin, A.C.R. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. В: Kontermann R and Dübel S (eds). Antibody Engineering. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.), находятся в зоне Вернье (Foote J and Winter G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol Biol. 224(2):487-99.),

локализуются на интерфейсе домена VH/VL (обобщено в Leger OJP and Saldanha J. (2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting. В: Shepherd P and Dean C (eds). Monoclonal Antibodies: a Practical Approach. Oxford, UK: Oxford University Press.),

чувствительны к посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование или пироглютамирование,

заняты остатками, которые, как предполагается, могут конфликтовать с CDR, согласно модели CDR 10C12, привитых к каркасам VH и VL, или

заняты остатками, которые редко встречаются среди секвенированных человеческих антител, где либо остаток родительского мышинного 10C12, либо какой-либо другой остаток гораздо более распространен в репертуаре человеческих антител.

Выравнивания мышинного 10C12 и различных гуманизованных антител показаны для переменных областей легкой цепи (табл. 28 и фиг. 8) и переменных областей тяжелой цепи (табл. 27 и фиг. 7).

Были сконструированы 2 варианта переменной области гуманизованной тяжелой цепи и 2 варианта переменной области гуманизованной легкой цепи, содержащие различные перестановки замен: hu10C12VHv1 или hu10C12VHv2, (SEQ ID NO: 214-215, соответственно); и hu10C12VLv1 или hu10C12VLv2, (SEQ ID NO: 216-217, соответственно) (табл. 27 и 28). Примеры гуманизованных конструкций Vk и Vh с обратными мутациями и другими мутациями, основанными на выбранных каркасах человека, показаны в табл. 27 и 28, соответственно. Области, выделенные жирным шрифтом, в табл. 27 и 28, обозначают CDR, согласно композитному определению по Kabat/Chothia. Знак "-" в столбцах табл. 27 и 28 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO: 214-215 и SEQ ID NO: 216-217 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в табл. 29. Аминокислоты в положениях в hu10C12VHv1 и hu10C12VHv2 перечислены в табл. 30. Аминокислоты в положениях в hu10C12VLv1 и hu10C12VLv2 перечислены в табл. 31.

Процентный показатель степени гуманизации для гуманизованных VH цепей hu10C12VHv1 и hu10C12VHv2 (SEQ ID NO: 214-215, соответственно) по отношению к наиболее сходному гену зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33), и для гуманизованных VL цепей hu10C12VLv1 и hu10C12VLv2 (SEQ ID NO: 216-217, соответственно) по отношению к наиболее сходному гену зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37), показан в табл. 32.

Таблица 27

Остаток по Кабат №	Линейный остаток №	FR или CDR	VH мышиного 10C12 (SEQ ID NO:7)	IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	SAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)	Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)
1	1	Fr1	E	E	Q	Q	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	S	T	T	T	T
18	18	Fr1	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	I	I	I	I
21	21	Fr1	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	T	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	V	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	Y	Y	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	T	N	N
29	29	CDR-H1	I	F	F	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	T	K	K
31	31	CDR-H1	D	D	D	D	D
32	32	CDR-H1	D	Y	Y	D	D

33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	N	H	H	N	N
35A		CDR-H1	-	-	-	-	-
35B		CDR-H1	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	Q	Q	Q	Q
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	G	G	G
43	43	Fr2	R	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	M	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L	L	W	W
51	51	CDR-H2	I	V	V	I	I
52	52	CDR-H2	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-
53	54	CDR-H2	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D	D	N	N
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	D	E	E	D	D
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	E	I	I	E	E
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	A	A	A	A	A
61	62	CDR-H2	S	E	E	S	S
62	63	CDR-H2	K	K	K	K	K
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	V	A	A
68	69	Fr3	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	M	I	I	M	M
70	71	Fr3	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A

72	73	Fr3	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D	D	D	D
77	78	Fr3	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M	M	M	M
81	82	Fr3	Q	E	E	E	E
82	83	Fr3	F	L	L	L	L
82A	84	Fr3	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	T	A	A	T	T
94	98	Fr3	T	T	R	T	T
95	99	CDR-H3	S	-	I	S	S
96		CDR-H3	-	-	P	-	-
97		CDR-H3	-	-	L	-	-
98		CDR-H3	-	-	F	-	-
99		CDR-H3	-	-	G	-	-
100		CDR-H3	-	-	R	-	-
100 A		CDR-H3	-	-	-	-	-
100B		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 C		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 D		CDR-H3	-	-	-	-	-
100E		CDR-H3	-	-	-	-	-
100F		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 G		CDR-H3	-	-	-	-	-
100		CDR-H3	-	-	-	-	-

<b>H</b>							
<b>100I</b>		<b>CDR-H3</b>	-	-	-	-	-
<b>100J</b>		<b>CDR-H3</b>	-	-	-	-	-
<b>100K</b>		<b>CDR-H3</b>	-	-	-	-	-
<b>101</b>	<b>100</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>N</b>	<b>Q</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
<b>102</b>	<b>101</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
103	102	Fr4	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G	G	G	G	G
105	104	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
106	105	Fr4	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	L	L	L	L	L
109	108	Fr4	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	T	S	S	S	S

Таблица 28

Остаток по Кабат №	Линейный остаток №	FR или CDR	VL мышного 10C12 (SEQ ID NO:11)	IGKY2-28*01 и IGTKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	SAB51297-VL_huFrvk (SEQ ID NO:35)	Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	A	S	S	S	S
8	8	Fr1	A	P	P	P	P
9	9	Fr1	F	L	L	L	L
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	N	L	L	L	L
12	12	Fr1	P	P	P	P	P
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	L	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	T	E	E	E	E
18	18	Fr1	S	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S

23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	K	Q	Q	K	K
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L
27D	31	CDR-L1	H	H	H	H	H
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1	-	-		-	-
28	33	CDR-L1	N	N	N	N	N
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	I	Y	Y	I	I
31	36	CDR-L1	T	N	N	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	Y	D	D	Y	Y
35	40	Fr2	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
37	42	Fr2	L	L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	K	K	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	Q	L	L	Q	Q
51	56	CDR-L2	M	G	G	M	M
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N
54	59	CDR-L2	L	R	R	L	L
55	60	CDR-L2	A	A	A	A	A
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D

61	66	Fr3	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	S	G	G	S	S
65	70	Fr3	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	R	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	V	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	A	M	M	A	A
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	N	A	A	N	N
92	97	CDR-L3	L	L	L	L	L
93	98	CDR-L3	E	Q	Q	E	E
94	99	CDR-L3	L	T	T	L	L
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	-	-	-	-	-
95B		CDR-L3	-	-	-	-	-
95C		CDR-L3	-	-	-	-	-
95D		CDR-L3	-	-	-	-	-
95E		CDR-L3	-	-	-	-	-
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	L	Y	L	L	L
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	A	Q	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	L	V	V	L
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	L	I	I	I	I
106A		Fr4	-	-	-	-	-
107	112	Fr4	K	K	K	K	K

Таблица 29. Обратные мутации V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> и другие мутации для гуманизованного 10C12

Вариант V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Последовательность акцептора экзона V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Изменения акцепторных каркасных остатков (или CDR) (на основе композитных определений CDR по Kabat/Chothia)
Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	Номер доступа в GenBank CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H24, H48, H67, H69, H93, H94
Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)	Номер доступа в GenBank CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H24, H48, H67, H69, H93, H94
Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	Номер доступа в GenBank CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	L64
Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)	Номер доступа в GenBank CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L64, L104

Таблица 30. Нумерация по Kabat каркасных остатков (или CDR) (на основе CDR согласно композитному определению Kabat/Chothia) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 10C12

Остаток	CAC20421-VH_huFrvk (SEQ ID NO:218)	IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	VH мышинного 10C12 (SEQ ID NO:7)	Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)
H1	Q	E	E	Q	E
H24	V	V	A	A	A
H48	M	M	I	I	I
H67	V	V	A	A	A
H69	I	I	M	M	M
H93	A	A	T	T	T
H94	R	T	T	T	T

Таблица 31. Нумерация по Kabat каркасных остатков (на основе CDR согласно композитному определению Kabat/Chothia) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 10C12

Остаток	CAB129/-VL_huFrvk (SEQ ID NO:35)	IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	VL мышинного 10C12 (SEQ ID NO:11)	Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)
L64	G	G	S	S	S
L104	V	L	L	V	L

Таблица 32. Процентный показатель степени гуманизации тяжелых и легких цепей гуманизированных антител 10C12

Вариант V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Степень
Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	81,6 %
Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)	82,7 %
Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	88,0 %
Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)	88,0 %

Положения, в которых канонические, верньерные или интерфейсные остатки различаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами на замену. Примеры взаимодействующих канонических остатков/остатков CDR включают остатки по Kabat H24 и H94 в табл. 27. Примеры верньерных остатков включают остатки по Kabat H48, H67, H69, H93 и H94 в табл. 27 и L64 в табл. 28. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остаток по Kabat H93 в табл. 27.

Обоснования выбора положений, указанных в табл. 27, в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов на замену являются следующими:

вариабельные области тяжелой цепи hu10C12VHv1

состоит из петель CDR-H1, H2 и H3 10C12-VH, привитых к каркасу SAC20421-VH. Кроме того, hu10C12VHv1 также возвращает все каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье или локализируются в интерфейсе домена VH/VL, способствуют структурной стабильности.

V24A: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье. M48I: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье.

V67A: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье и подвергается обратной мутации для сохранения конформации CDR.

I69M: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье, и обратная мутация сделана для сохранения целостности упаковки CDR.

A93T: Положение H93 представляет собой остаток интерфейса VH/VL и подвергается обратной мутации на Thr для сохранения целостности интерфейса антитела.

R94T: представляет собой обратную мутацию канонического структурного остатка по Chothia. R94T также представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Thr находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

hu10C12VHv2

10C12VHv2 сохраняет все возвращенные каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье или локализируются в интерфейсе домена VH/VL, способствуют структурной стабильности. Кроме того, hu10C12VHv2 включает обратные мутации или замену на наиболее часто встречающийся остаток в данном положении и для оптимизации дезаминирования, окисления, N-гликозилирования, протеолиза и агрегации. Мутации в VHv2, которые не включены в hu10C12VHv1:

Q1E: представляет собой мутацию, повышающую стабильность, для уменьшения потенциала образования пироглутамата и снижения гетерогенности N-конца (Liu, выше).

Обоснования выбора положений, указанных в табл. 28, в вариабельной области легкой цепи в качестве кандидатов на замену являются следующими.

вариабельные области легкой каппа-цепи

hu10C12VLv1

состоит из петель CDR-L1, L2 и L3 10C12-VL, привитых на каркас CAB51297-VL. Кроме того, hu10C12VLv1 также возвращает все каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье или локализируются в интерфейсе домена VH/VL, способствуют структурной стабильности.

G64S: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье. Обратная мутация G64S сохраняет упаковку CDR.

hu10C12VLv2

сохраняет все возвращенные каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье или локализируются в интерфейсе домена VH/VL, способствуют структурной стабильности. Кроме того, hu10C12VLv2 включает обратные мутации или замену на наиболее часто встречающийся остаток в данном положении и для оптимизации дезаминирования, окисления, N-гликозилирования, протеолиза и агрегации. Мутации в VLv2, которые не включены в hu10C12VLv1:

V104L: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Leu находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

На основе этих человеческих каркасов были разработаны следующие варианты: вариабельные области тяжелой цепи

>hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQQAPGKGLEWIGWIDPENGD  
TEYASKFQGRATMTADTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGLVTVSS

>hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQQAPGKGLEWIGWIDPENGD  
TEYASKFQGRATMTADTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGLVTVSS

вариабельные области легкой каппа-цепи

>hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYWLQKPGQSPQLLIYQMSNLA  
S  
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK

>hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYWLQKPGQSPQLLIYQMSNLA  
S  
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKLEIK

Гуманизированные последовательности генерируют с использованием протокола двухэтапной ПЦР, который позволяет вводить множественные мутации, делеции и вставки с использованием сайт-направленного мутагенеза QuikChange [Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) *BioTechniques* 26:680-682].

Пример 10. Конструирование гуманизированных антител 12C4

Исходным или донорским антителом для гуманизации было мышинное антитело 12C4. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи зрелого m12C4 представлена как SEQ ID NO: 219. Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи зрелого m12C4 представлена как SEQ ID NO: 11. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно композитному определению по Kabat/Chothia K представлены как SEQ ID NO: 8, 220 и 10, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи по Kabat представлены как SEQ ID NO: 12-14, соответственно. Во всем тексте используется нумерация по Kabat.

Переменная каппа (Vk) 12C4 принадлежит к мышинной подгруппе 2 по Vk, которая соответствует человеческой подгруппе 2 по Vk, а переменная тяжелой цепи (Vh) принадлежит к мышинной подгруппе 2с по Vh, которая соответствует человеческой подгруппе 1 по Vh [Kabat E. A., et al., (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*. NIH Publication No. 91-3242]. CDR-L1 по Chothia 16 остатков подобна каноническому классу 4 по Chothia, CDR-L2 по Chothia 7 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia, CDR-L3 по Chothia 9 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia [Martin ACR. (2010) *Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains*. B: Kontermann R and Dübel S (eds). *Antibody Engineering*. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.. [Martin, 2010].

CDR-H1 по Chothia 10 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia, CDR-H2 по Chothia 17 остатков подобна каноническому классу 2 по Chothia [Martin, 2010]. CDR-H3 по Chothia 3 остатков не имеет канонических классов. Был проведен поиск последовательностей белков в базе данных PDB [Deshpande N, et al., (2005) *Nucleic Acids Res.* 33: D233-7], чтобы найти конструкции, которые обеспечили бы приблизительную структурную модель 12C4. Кристаллическая структура fab антитела с кодом pdb 50BF [Vicentini, et al., 2017, не опубликовано] использовалась как для структуры Vh, так и для Vk, поскольку она имела хорошее разрешение (1,92Å) и общее сходство последовательностей с Vh и Vk 12C4, сохраняя те же канонические структуры для петель.

Каркасы VH 12C4 имеют высокую степень сходства с соответствующими областями варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина [*Homo sapiens*] CAC20421, клонированного Arnold-Schild et al. [*Cancer Res.* 60 (15), 4175-4178 (2000)]. Точно так же каркасы VL 12C4 имеют высокую степень сходства последовательностей с соответствующими областями VL человеческого антитела CAB51297, клонированного Capello et al. (исх. номер в GenBank CAB51297, подано 20 июля 1999 г., не опубликовано). Варибельный домен легкой цепи антител 12C4 и CAB51297 также имеет одинаковую длину в отношении петель CDR-L1, L2 и L3. Соответственно, каркасные области и VH CAC20421 и VL CAB51297 были выбраны в качестве акцепторных последовательностей для CDR VL 12C4. Модель CDR 12C4, привитых к соответствующим человеческим каркасам для VH и VL, была построена и использовалась в качестве руководства для дальнейших обратных мутаций.

Последовательности вариантов тяжелой и легкой цепей, полученные в результате процесса гуманизации антител, дополнительно выравнивали с последовательностями зародышевой линии человека с использованием инструмента IMGT Domain GapAlign для оценки степени гуманизации тяжелой и легкой цепей, как указано в руководящих принципах комитета ВОЗ по МНН. (WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review) (Internet) 2014. Доступно по адресу: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) Остатки были изменены для выравнивания с соответствующей последовательностью зародышевой линии человека, где это возможно, для повышения степени гуманизации и снижения потенциальной иммуногенности. Для гуманизированных вариантов VLv1 и VLv2 были введены мутации, чтобы сделать последовательности более похожими на ген зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37). Для гуманизированных вариантов VHv1 и VHv2 были введены мутации, чтобы сделать последовательности более похожими на ген зародышевой линии человека IGHV-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33)

Дополнительные версии hu12C4-VH и hu12C4-VL были сконструированы для обеспечения возможности оценки различных каркасных остатков на предмет их вклада в связывание антигена, термостабильность и иммуногенность, а также для оптимизации дезаминирования, окисления, N-гликозилирования, протеолиза и агрегации. Положения, рассматриваемые для мутации, включают те,

которые

определяют канонические конформации CDR (обобщено в Martin, A.C.R. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. B: Kontermann R and Dübel S (eds). Antibody Engineering. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.),

находясь в зоне Вернье (Foote J and Winter G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol Biol. 224(2):487-99),

локализуются на интерфейсе домена VH/VL (обобщено в Leger OJP and Saldanha J. (2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting. B: Shepherd P and Dean C (eds). Monoclonal Antibodies: a Practical Approach. Oxford, UK: Oxford University Press.),

чувствительны к посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование или пироглютаминирование,

заняты остатками, которые, как предполагается, могут конфликтовать с CDR, согласно модели CDR 12C4, привитых к каркасам VH и VL, или

заняты остатками, которые редко встречаются среди секвенированных человеческих антител, где либо остаток родительского мышиного 12C4, либо какой-либо другой остаток гораздо более распространен в репертуаре человеческих антител.

Выравнивания мышиного 12C4 и различных гуманизированных антител показаны для переменных областей легкой цепи (табл. 34 и фиг. 10) и переменных областей тяжелой цепи (табл. 33 и фиг. 9).

Были сконструированы 2 варианта переменной области гуманизированной тяжелой цепи и 2 варианта переменной области гуманизированной легкой цепи, содержащие различные перестановки замен: hu12C4VHv1 или hu12C4VHv2, (SEQ ID NO: 221-222, соответственно); и hu12C4VLv1 или hu12C4VLv2, (SEQ ID NO: 223-224, соответственно) (табл. 33 и 34). Примеры гуманизированных конструкций Vk и Vh с обратными мутациями и другими мутациями, основанными на выбранных каркасах человека, показаны в табл. 33 и 34 соответственно. Области, выделенные жирным шрифтом, в табл. 33 и 34, обозначают CDR, согласно композитному определению по Kabat/Chothia. Знак "-" в столбцах табл. 33 и 34 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO: 221-222 и SEQ ID NO: 223-224 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в табл. 35. Аминокислоты в положениях в hu12C4VHv1 и hu12C4VHv2 перечислены в табл. 36. Аминокислоты в положениях в hu12C4VLv1 и hu12C4VLv2 перечислены в табл. 37.

Процентный показатель степени гуманизации для гуманизированных VH цепей hu12C4VHv1 и hu12C4VHv2 (SEQ ID NO: 221-222, соответственно) по отношению к наиболее сходному гену зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33), и для гуманизированных VL цепей hu12C4VLv1 и hu12C4VLv2 (SEQ ID NO: 223-224, соответственно) по отношению к наиболее сходному гену зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37), показан в табл. 38.

Таблица 33

Остаток по Kabat №	Линейный остаток №	FR или CDR	VH мышиного 12C4 (SEQ ID NO:219)	IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421 VH (SEQ ID NO:218)	Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)
1	1	Fr1	E	E	Q	Q	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q

4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	S	T	T	T	T
18	18	Fr1	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	I	I	I	I
21	21	Fr1	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	T	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	V	V	V
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	<b>CDR-H1</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
27	27	<b>CDR-H1</b>	<b>F</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>F</b>
28	28	<b>CDR-H1</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
29	29	<b>CDR-H1</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>I</b>	<b>I</b>
30	30	<b>CDR-H1</b>	<b>K</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>K</b>
31	31	<b>CDR-H1</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
32	32	<b>CDR-H1</b>	<b>D</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
33	33	<b>CDR-H1</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>
34	34	<b>CDR-H1</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>
35	35	<b>CDR-H1</b>	<b>N</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
35A		<b>CDR-H1</b>	-	-	-	-	-
35B		<b>CDR-H1</b>	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	R	Q	Q	Q	Q
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	G	G	G
43	43	Fr2	R	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W

48	48	Fr2	I	M	M	M	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L	L	W	W
51	51	CDR-H2	I	V	V	I	I
52	52	CDR-H2	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-
53	54	CDR-H2	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D	D	N	N
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	D	E	E	D	D
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	A	I	I	A	A
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	A	A	A	A	A
61	62	CDR-H2	S	E	E	S	S
62	63	CDR-H2	K	K	K	K	K
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	V	V	V
68	69	Fr3	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	M	I	I	I	I
70	71	Fr3	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D	D	D	D
77	78	Fr3	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M	M	M	M
81	82	Fr3	Q	E	E	E	E
82	83	Fr3	F	L	L	L	L
82A	84	Fr3	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	S	T	T	T	T

88	92	Fr3	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	T	A	A	A	T
94	98	Fr3	T	T	R	R	T
<b>95</b>	<b>99</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>S</b>	<b>-</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>96</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>P</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>97</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>L</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>98</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>F</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>99</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>G</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>R</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100A</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100B</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100C</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100D</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100E</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100F</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100G</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100H</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100I</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100J</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100K</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>101</b>	<b>100</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>N</b>	<b>Q</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
<b>102</b>	<b>101</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
103	102	Fr4	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G	G	G	G	G
105	104	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
106	105	Fr4	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	L	L	L	L	L
109	108	Fr4	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	A	S	S	S	S

Таблица 34

Остаток по Kabat №	Линейный остаток №	FR или CDR	VL мышиного 12С4 (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	SABS1297 VL (SEQ ID NO:35)	Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	A	S	S	S	S
8	8	Fr1	A	P	P	P	P
9	9	Fr1	F	L	L	L	L
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	N	L	L	L	L
12	12	Fr1	P	P	P	P	P
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	L	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	T	E	E	E	E
18	18	Fr1	S	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I

22	22	Fr1	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	K	Q	Q	K	K
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L
27D	31	CDR-L1	H	H	H	H	H
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1	-	-	-	-	-
28	33	CDR-L1	N	N	N	N	N
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	I	Y	Y	I	I
31	36	CDR-L1	T	N	N	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	Y	D	D	Y	Y
35	40	Fr2	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
37	42	Fr2	L	L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	K	K	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	Q	L	L	Q	Q
51	56	CDR-L2	M	G	G	M	M
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N
54	59	CDR-L2	L	R	R	L	L
55	60	CDR-L2	A	A	A	A	A
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G

58	63	Fr3	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	S	G	G	G	S
65	70	Fr3	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	R	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	V	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C
89	94	<b>CDR-L3</b>	A	M	M	A	A
90	95	<b>CDR-L3</b>	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	<b>CDR-L3</b>	N	A	A	N	N
92	97	<b>CDR-L3</b>	L	L	L	L	L
93	98	<b>CDR-L3</b>	E	Q	Q	E	E
94	99	<b>CDR-L3</b>	L	T	T	L	L
95	100	<b>CDR-L3</b>	P	P	P	P	P
95A		<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-	-
95B		<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-	-
95C		<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-	-
95D		<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-	-

95E		CDR-L3	-	-	-	-	-
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	L	Y	L	L	L
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	A	Q	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	L	V	V	L
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	L	I	I	I	I
106A		Fr4	-	-	-	-	-
107	112	Fr4	K	K	K	K	K

Таблица 35. Обратные мутации V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> и другие мутации для гуманизированного 12C4

Вариант V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Последовательность акцептора экзона V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Изменения акцепторных каркасных остатков (или CDR) (на основе композитных определений CDR по Kabat/Chothia)
Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	Номер доступа в GenBank CAC20421 VH (SEQ ID NO:218)	Отсутствует
Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)	Номер доступа в GenBank CAC20421 VH (SEQ ID NO:218) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H48, H93, H94
Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	Номер доступа в GenBank CAB51297 VL (SEQ ID NO:35)	Отсутствует
Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)	Номер доступа в GenBank CAB51297 VL (SEQ ID NO:35) IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L64, L104

Таблица 36. Нумерация по Kabat каркасных остатков (или CDR) (на основе CDR согласно композитному определению Kabat/Chothia) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 12C4

Остаток	CAC20421 VH (SEQ ID NO:218)	IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	VH мышинного 12C4 (SEQ ID NO:219)	Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)
H1	Q	E	E	Q	E
H48	M	M	I	M	I
H93	A	A	T	A	T
H94	R	T	T	R	T

Таблица 37. Нумерация по Kabat каркасных остатков (на основе CDR согласно композитному определению Kabat/Chothia) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 12C4

Остаток	CAB51297 VL (SEQ ID NO:35)	IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	VL мышинного 12C4 (SEQ ID NO:11)	Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)
L64	G	G	S	G	S
L104	V	L	L	V	L

Таблица 38. Процентный показатель степени гуманизации тяжелых и легких цепей гуманизированных антител 12C4

Вариант V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Степень
Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	86,6%
Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)	85,7%
Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	89,0 %
Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)	88,0 %

Положения, в которых канонические, верньерные или интерфейсные остатки различаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами на замену. Примеры взаимодействующих канонических остатков/остатков CDR включают остаток по Kabat H94 в табл. 33. Примеры верньерных остатков включают остатки по Kabat H48, H93 и H94 в табл. 33 и L64 в табл. 34. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остаток по Kabat H93 в табл. 33.

Обоснования выбора положений, указанных в табл. 33, в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов на замену являются следующими:

варибельные области тяжелой цепи

hu12C4VHv1

состоит из петель CDR-H1, H2 и H3 12C4-VH, привитых на каркас CAC20421.

hu12C4VHv2

возвращает все каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье, или локализируются на интерфейсе доменов VH/VL или способствуют структурной стабильности. 12C4-VH\_v2 включает обратные мутации или

замену на наиболее часто встречающийся остаток в указанном положении.

Q1E: представляет собой мутацию, повышающую стабильность, для уменьшения потенциала образования пироглутамата и снижения гетерогенности N-конца (Liu, выше)

M48I: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье.

A93T: представляет собой обратную мутацию остатка интерфейса VH/VL и подвергается обратной мутации для сохранения интерфейса.

R94T: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье. R94T также представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Thr находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

Обоснования выбора положений, указанных в табл. 34, в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов на замену являются следующими.

варибельные области легкой каппа-цепи

hu12C4VLv1

состоит из петель CDR-L1, L2 и L3 12C4-VL, привитых к каркасу VL CAB51297 наряду с возвратом всех каркасных замен в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье или расположены на интерфейсе доменов VH/VL. Для hu12C4VLv1 ни одно положение, кроме G64, не соответствует данному критерию, поэтому обратная мутация не осуществляется. На основании анализа модели гомологии Gly в положении 64 может быть переносимым, поэтому изменения в положении 64 в 12C4VLv1 не вносятся, попытка замены на Ser принята в hu12C4VLv2.

Hu12C4VLv2

hu12C4VLv2 включает замены, которые способствуют структурной стабильности или увеличивают степень гуманизации антитела.

G64S: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье. Обратная мутация G64S сохраняет упаковку CDR.

V104L: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Leu находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

На основе этих человеческих каркасов были разработаны следующие варианты: варибельные области тяжелой цепи

>hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDDYMNWVQQAPGKGLEWMGWIDPENG

DTAYASKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSNGWGQGLVTVSS

>hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDDYMNWVQQAPGKGLEWIGWIDPENG

TAYASKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGLVTVSS

варибельные области легкой каппа-цепи

>hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGLTYLYWYLYQKPGQSPQLLIYQMSNLA

GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK

>hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGLTYLYWYLYQKPGQSPQLLIYQMSNLA

GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKLEIK

Гуманизированные последовательности генерируют с использованием протокола двухэтапной ПЦР, который позволяет вводить множественные мутации, делеции и вставки с использованием сайт-направленного мутагена QuikChange [Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) BioTechniques 26:680-682].

Пример 11. Конструирование гуманизированных антител 17C12

Исходным или донорским антителом для гуманизации было мышинное антитело 17C12. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи зрелого m17C12 представлена как SEQ ID NO: 225. Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи зрелого m17C12 представлена как SEQ ID NO: 228. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно композитному определению по Kabat/Chothia K представлены как SEQ ID NO: 226, 227 и 10, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи по Kabat представлены как SEQ ID NO: 229-231 соответственно. Во всем тексте используется нумерация по Kabat.

Переменная каппа (Vk) 17C12 принадлежит к мышинной подгруппе 2 по Vk, которая соответствует человеческой подгруппе 3 по Vk, а переменная тяжелой цепи (Vh) принадлежит к мышинной подгруппе 2с по Vh, которая соответствует человеческой подгруппе 1 по Vh [Kabat E. A., et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242]. CDR-L1 по Chothia 16 остат-

ков подобна каноническому классу 4 по Chothia, CDR-L2 по Chothia 7 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia, CDR-L3 по Chothia 9 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia [Martin ACR. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. B: Kontermann R and Dübel S (eds). Antibody Engineering. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.. [Martin, 2010]. CDR-H1 по Chothia 10 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia, CDR-H2 по Chothia 17 остатков подобна каноническому классу 2 по Chothia [Martin, 2010]. CDR-H3 по Chothia 3 остатков не имеет канонических классов. Был проведен поиск последовательностей белков в базе данных PDB [Deshpande N, et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33: D233-7], чтобы найти конструкции, которые обеспечили бы приблизительную структурную модель 17C12. Кристаллическая структура fab антитела с кодом pdb 3PP3 [Niederfellner, et al., 2011., Blood 118: 358-367] использовалась как для структуры Vh, так и для Vk, поскольку она имела хорошее разрешение (2,51Å) и общее сходство последовательностей с Vh и Vk 17C12, сохраняя те же канонические структуры для петель.

Каркасы VH 17C12 имеют высокую степень сходства с соответствующими областями человеческого антитела SAC20421, клонированного Arnold-Schild, et al [Cancer Res. 60 (15), 4175-4178 (2000)]. Вариабельные домены тяжелых цепей 17C12 и SAC20421 также имеют одинаковую длину в отношении петель CDR-H1, H2. Точно так же каркасы VL 17C12 имеют высокую степень сходства последовательностей с соответствующими областями VL человеческого антитела QDO16713, клонированного Cho et al [Cell Rep 28 (4), 909-922.e6 (2019)]. Вариабельный домен легкой цепи антител 17C12 и QDO16713 также имеет одинаковую длину в отношении петель CDR-L1, L2 и L3. Соответственно, каркасные области и VH SAC20421 и VL QDO16713 были выбраны в качестве акцепторных последовательностей для CDR 17C12. Модель CDR 17C12, привитых к соответствующим человеческим каркасам для VH и VL, была построена и использовалась в качестве руководства для дальнейших обратных мутаций.

Последовательности вариантов тяжелой и легкой цепей, полученные в результате процесса гуманизации антител, дополнительно выравнивали с последовательностями зародышевой линии человека с использованием инструмента IMGT Domain GapAlign для оценки степени гуманизации тяжелой и легкой цепей, как указано в руководящих принципах комитета ВОЗ по МНН. (WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review) (Internet) 2014. Доступно по адресу: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) Остатки были изменены для выравнивания с соответствующей последовательностью зародышевой линии человека, где это возможно, для повышения степени гуманизации и снижения потенциальной иммуногенности. Для гуманизованных вариантов VLv2 и VLv2 были введены мутации, чтобы сделать последовательности более похожими на ген зародышевой линии человека IGKV2-29\*02 и IGKJ4\*01 (SEQ ID NO: 239) Для гуманизованных вариантов VHv1 и VHv были введены мутации, чтобы сделать последовательности более похожими на ген зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33).

Дополнительные версии hu17C12-VH и hu17C12-VL были сконструированы для обеспечения возможности оценки различных каркасных остатков на предмет их вклада в связывание антигена, термостабильность и иммуногенность, а также для оптимизации дезаминирования, окисления, N-гликозилирования, протеолиза и агрегации. Положения, рассматриваемые для мутации, включают те, которые

определяют канонические конформации CDR (обобщено в Martin, A.C.R. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. B: Kontermann R and Dübel S (eds). Antibody Engineering. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.),

находятся в зоне Вернье (Foote J and Winter G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol Biol. 224(2):487-99),

локализуются на интерфейсе домена VH/VL (обобщено в Leger OJP and Saldanha J. (2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting. B: Shepherd P and Dean C (eds). Monoclonal Antibodies: a Practical Approach. Oxford, UK: Oxford University Press.),

чувствительны к посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование или пироглютамирование,

заяты остатками, которые, как предполагается, могут конфликтовать с CDR, согласно модели CDR 17C12, привитых к каркасам VH и VL, или

заяты остатками, которые редко встречаются среди секвенированных человеческих антител, где либо остаток родительского мышинного 17C12, либо какой-либо другой остаток гораздо более распространен в репертуаре человеческих антител.

Выравнивания мышинного 17C12 и различных гуманизованных антител показаны для вариабельных областей легкой цепи (табл. 40 и фиг. 12) и вариабельных областей тяжелой цепи (табл. 39 и фиг. 11).

Были сконструированы 2 варианта вариабельной области гуманизованной тяжелой цепи и 2 варианта вариабельной области гуманизованной легкой цепи, содержащие различные перестановки замен: hu17C12VHv1 или hu17C12VHv2 (SEQ ID NO: 232-233, соответственно); и hu17C12VLv1 или hu17C12VLv2 (SEQ ID NO: 234-235, соответственно) (табл. 39 и 40). Примеры гуманизованных конст-

рукций Vk и Vh с обратными мутациями и другими мутациями, основанными на выбранных каркасах человека, показаны в табл. 39 и 40 соответственно. Области, выделенные жирным шрифтом, в табл. 39 и 40, обозначают CDR, согласно композитному определению по Kabat/Chothia. Знак "-" в столбцах табл. 39 и 40 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO: 232-233 и SEQ ID NO: 234-235 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в табл. 41. Аминокислоты в положениях в hu17C12VHv1 и hu17C12VHv2 перечислены в табл. 42. Аминокислоты в положениях в hu17C12VLv1 и hu17C12VLv2 перечислены в табл. 43.

Процентный показатель степени гуманизации для гуманизированных VH цепей hu17C12VHv1 и hu17C12VHv2 (SEQ ID NO: 232-233, соответственно) по отношению к наиболее сходному гену зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33), и для гуманизированных VL цепей hu17C12VLv1 и hu17C12VLv2 (SEQ ID NO: 234-235 соответственно) по отношению к наиболее сходному гену зародышевой линии человека IGKV2-29\*02 и IGKJ4\*01 (SEQ ID NO: 239), показан в табл. 44.

Таблица 39

Остаток по Kabat №	Линейный остаток №	FR или CDR	VH мышного 17C12 (SEQ ID NO:225)	IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID:218)	Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:233)
1	1	Fr1	K	E	Q	Q	E
2	2	Fr1	I	V	V	I	I
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	S	T	T	T	T
18	18	Fr1	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	I	I	I	I

21	21	Fr1	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	T	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	V	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	A	G	G	A	A
27	27	CDR-H1	F	Y	Y	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	T	N	N
29	29	CDR-H1	I		F	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	T	K	K
31	31	CDR-H1	D	D	D	D	D
32	32	CDR-H1	D	Y	Y	D	D
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	N	H	H	N	N
35A		CDR-H1	-	-	-	-	-
35B		CDR-H1	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	Q	Q	Q	Q
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	G	G	G
43	43	Fr2	R	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	M	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L	L	W	W
51	51	CDR-H2	I	V	V	I	I
52	52	CDR-H2	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-
53	54	CDR-H2	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D	D	N	N
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	D	E	E	D	D
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	K	I	I	K	K
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y

60	61	CDR-H2	A	A	A	A	A
61	62	CDR-H2	S	E	E	S	S
62	63	CDR-H2	K	K	K	K	K
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	V	A	A
68	69	Fr3	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	M	I	I	M	M
70	71	Fr3	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D	D	D	D
77	78	Fr3	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M	M	M	M
81	82	Fr3	Q	E	E	E	E
82	83	Fr3	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	T	A	A	T	T
94	98	Fr3	T	T	R	T	T
95	99	CDR-H3	S		I	S	S
96		CDR-H3	-	-	P	-	-
97		CDR-H3	-	-	L	-	-
98		CDR-H3	-	-	F	-	-
99		CDR-H3	-	-	G	-	-
100		CDR-H3	-	-	R	-	-

100A		CDR-H3	-	-	-	-	-
100B		CDR-H3	-	-	-	-	-
100C		CDR-H3	-	-	-	-	-
100D		CDR-H3	-	-	-	-	-
100E		CDR-H3	-	-	-	-	-
100F		CDR-H3	-	-	-	-	-
100G		CDR-H3	-	-	-	-	-
100H		CDR-H3	-	-	-	-	-
100I		CDR-H3	-	-	-	-	-
100J		CDR-H3	-	-	-	-	-
100K		CDR-H3	-	-	-	-	-
101	100	CDR-H3	N	Q	D	N	N
102	101	CDR-H3	G	H	H	G	G
103	102	Fr4	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G	G	G	G	G
105	104	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
106	105	Fr4	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	L	L	T	T	L
109	108	Fr4	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	A	S	R	R	S

Таблица 40

Остаток по Kabat №	Линейный остаток №	FR или CDR	VL мышного 17C12 (SEQ ID NO: 228)	IGKV2-29*02 и IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)	QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238)	Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:234)	Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:235)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	V	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T

6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	T	T	T	T
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	S	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
18	18	Fr1	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	<b>CDR-L1</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
25	25	<b>CDR-L1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
26	26	<b>CDR-L1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
27	27	<b>CDR-L1</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>
27A	28	<b>CDR-L1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
27B	29	<b>CDR-L1</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>
27C	30	<b>CDR-L1</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>
27D	31	<b>CDR-L1</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>
27E	32	<b>CDR-L1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
27F		<b>CDR-L1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
28	33	<b>CDR-L1</b>	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
29	34	<b>CDR-L1</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
30	35	<b>CDR-L1</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>K</b>
31	36	<b>CDR-L1</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
32	37	<b>CDR-L1</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>
33	38	<b>CDR-L1</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>
34	39	<b>CDR-L1</b>	<b>H</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>H</b>	<b>H</b>
35	40	Fr2	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	L	Y	Y	L	L
37	42	Fr2	L	L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	R	K	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	P	P	S

44	49	Fr2	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	K	Q	Q	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	L	E	E	L	L
51	56	CDR-L2	V	V	V	V	V
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	K	S	N	K	K
54	59	CDR-L2	L	R	R	L	L
55	60	CDR-L2	E	F	F	E	E
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	K	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	L	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y

88	93	Fr3	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	L	M	M	L	L
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	T	G	S	T	T
92	97	CDR-L3	T	I	I	T	T
93	98	CDR-L3	H	H	Q	H	H
94	99	CDR-L3	F	L	L	F	F
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	-	-	-	-	-
95B		CDR-L3	-	-	-	-	-
95C		CDR-L3	-	-	-	-	-
95D		CDR-L3	-	-	-	-	-
95E		CDR-L3	-	-	-	-	-
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	R	L	P	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	K	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		Fr4	-	-	-	-	-
107	112	Fr4	K	K	K	K	K

Таблица 41. Обратные мутации V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> и другие мутации для гуманизованного 17C12

Вариант V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Последовательность акцептора экзона V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Изменения акцепторных каркасных остатков (или CDR) (на основе композитных определений CDR по Kabat/Chothia)
Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	Номер доступа в GenBank CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H2, H24, H48, H67, H69, H93, H94

Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:232)	Номер доступа в GenBank CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218) IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1, H2, H24, H48, H67, H69, H93, H94, H108, H113
Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:233)	Номер доступа в GenBank QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238)	L2, L36
Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:234)	Номер доступа в GenBank QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238) IGKV2-29*02 и IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)	L2, L36, L43

Таблица 42. Нумерация по Kabat каркасных остатков (или CDR) (на основе CDR согласно композитному определению Kabat/Chothia) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 17C12

Остаток	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)	IMGT № IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	VH мышинного 17C12 (SEQ ID NO:225)	Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:233)
H1	Q	E	K	Q	E
H2	V	V	I	I	I
H24	V	V	A	A	A
H48	M	M	I	I	I
H67	V	V	A	A	A
H69	I	I	M	M	M
H93	A	A	T	T	T
H94	R	T	T	T	T
H108	T	L	L	T	L
H113	R	S	A	R	S

Таблица 43. Нумерация по Kabat каркасных остатков (на основе CDR согласно композитному определению Kabat/Chothia) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 17C12

Остаток	QDD016713-VL_huFrvk (SEQ ID NO:238)	IGKV2-29*02 и IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)	VL мышинного 17C12 (SEQ ID NO:228)	Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:234)	Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:235)
L2	I	I	V	V	V
L36	Y	Y	L	L	L
L43	P	S	S	P	S

Таблица 44. Процентный показатель степени гуманизации тяжелых и легких цепей гуманизированных антител 17C12

Вариант V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Степень
Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	79,6%
Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:233)	80,6%
Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:234)	85,0%
Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:235)	86,0%

Обоснования выбора положений, указанных в табл. 39, в вариабельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов на замену являются следующими:

вариабельные области тяжелой цепи

hu17C12VHv1

состоит из петель CDR-H1, H2 и H3 17C12-VH, привитых на каркас SAC20421. Кроме того, hu17C12VHv1 также возвращает все каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье или локализируются в интерфейсе домена VH/VL, способствуют структурной стабильности.

V2I: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье для сохранения зоны Вернье.

V24A: представляет собой обратную мутацию остатка канонической структуры по Chothia, и обратная мутация может повысить стабильность.

M48I: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье.

V67A: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье и подвергается обратной мутации для сохранения конформации CDR.

I69M: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье, и обратная мутация сделана для сохранения целостности упаковки CDR.

A93T: представляет собой обратную мутацию остатка интерфейса VH/VL и подвергается обратной мутации для сохранения целостности интерфейса антитела.

R94T: представляет собой обратную мутацию канонического структурного остатка по Chothia. R94T также представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Thr находится в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

hu17C12VHv2

hu17C12VHv2 также сохраняет все возвращенные каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье или локализируются в интерфейсе домена VH/VL,

способствуют структурной стабильности. Кроме того, hu17C12VHv2 включает обратные мутации или замену на наиболее часто встречающийся остаток в данном положении и для оптимизации дезаминирования, окисления, N-гликозилирования, протеолиза и агрегации. Мутации в hu17C12VHv2, которые не включены в hu17C12VHv1:

Q1E: представляет собой мутацию, повышающую стабильность, для уменьшения потенциала образования пироглутамата и снижения гетерогенности N-конца (Liu, выше).

T108L: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Leu находится в гене

зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) в этом положении.

R113S: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию. Arg в этом положении встречается редко, а Ser в гене зародышевой линии человека IGHV1-69-2\*01 (SEQ ID NO: 33) встречается в этом положении и является наиболее частым остатком в этом положении.

Обоснования выбора положений, указанных в табл. 40, в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов на замену являются следующими.

варибельные области легкой каппа-цепи hu17C12VLv1

состоит из петель CDR-L1, L2 и L3 17C12-VL, привитых к каркасу VL QDO16713 наряду с возвратом всех каркасных замен в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье или расположены на интерфейсе доменов VH/VL.

I2V: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье и обратная мутация осуществляется для сохранения конформации упаковки CDR.

Y36L: представляет собой обратную мутацию остатка интерфейса VH/VL и зоны Вернье, и обратная мутация осуществляется для сохранения целостности интерфейса.

hu17C12VLv2

hu17C12VLv2 включает замены, которые способствуют структурной стабильности или увеличивают степень гуманизации антитела.

P43S: представляет собой частотную и выравнивающую зародышевую линию мутацию. Pro в этом положении встречается редко и заменяется на Ser, который имеется в этом положении в гене зародышевой линии человека IGKV2-29\*02 & IGKJ4\*01 (SEQ ID NO: 239).

На основе этих человеческих каркасов были разработаны следующие варианты: варибельные области тяжелой цепи

>hu17C12VHv1

QIQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASAFNIKDDYMNWVQQAPGKLEWIGWIDPENGDT  
KYASKFQGRATMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSR

>hu17C12VHv2

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGGKATMTADTSTNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

варибельные области легкой каппа-цепи

>hu17C12VLv1

DVVMQTPLSLSVTPGQPASISCTSSQSLLSNRKTYLHWLLQKPGQPPQLLIYLVSKLE  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQTHFPRTFGGGTKVEIK

>hu17C12VLv2

DVVMQTPLSLSVTPGQPASISCTSSQSLLSNRKTYLHWLLQKPGQSPQLLIYLVSKLE  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQTHFPRTFGGGTKVEIK

Гуманизированные последовательности генерируют с использованием протокола двухэтапной ПЦР, который позволяет вводить множественные мутации, делеции и вставки с использованием сайт-направленного мутагенеза QuikChange [Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) BioTechniques 26:680-682].

Пример 12. Конструирование гуманизированных антител 14H3

Исходным или донорским антителом для гуманизации было мышинное антитело 14H3. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи зрелого m14H3 представлена как SEQ ID NO: 240. Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи зрелого m14H3 представлена как SEQ ID NO: 244. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно композитному определению по Kabat/Chothia представлены как SEQ ID NO: 241-243 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи по Kabat представлены как SEQ ID NO: 245-247 соответственно. Во всем тексте используется нумерация по Kabat.

Переменная каппа (Vk) 14H3 принадлежит к мышинной подгруппе 2 по Vk, которая соответствует человеческой подгруппе 2 по Vk, а переменная тяжелой цепи (Vh) принадлежит к мышинной подгруппе 1b по Vh, которая соответствует человеческой подгруппе 2 по Vh [Kabat E.A., et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242]. CDR-L1 по Chothia 16 остатков подобна каноническому классу 4 по Chothia, CDR-L2 по Chothia 7 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia, а CDR-L3 по Chothia 9 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia [Martin ACR. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. B: Kontermann R and Dübel S (eds). Antibody Engineering. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.. [Martin, 2010].

CDR-H1 по Chothia 12 остатков подобна каноническому классу 3 по Chothia, CDR-H2 по Chothia 16 остатков подобна каноническому классу 1 по Chothia [Martin, 2010], а CDR-H3 по Chothia 4 остатков не имеет канонических классов. Был проведен поиск последовательностей белков в базе данных PDB [Deshpande N, et al., (2005) *Nucleic Acids Res.* 33: D233-7], чтобы найти конструкции, которые обеспечили бы приблизительную структурную модель 14H3. Кристаллическая структура Fab антитела с кодом pdb 2VQ1 [De Geus, D.C., et al. *Proteins* 76: 439; (2009)] использовалась как для структуры Vh, так и для Vk, поскольку она имела хорошее разрешение (2,5Å) и общее сходство последовательностей с Vh и Vk 14H3, сохраняя те же канонические структуры для петель.

Каркасы VH 14H3 имеют высокую степень сходства с соответствующими областями вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина [*Homo sapiens*] QDJ57937 клонированного Cassotta et al. [(2009) Cassotta, A., Mikol, V., Bertrand, T., et al. A single T cell epitope drives the neutralizing anti-idiotypic antibody response to natalizumab in patients with multiple sclerosis Unpublished (прямая подача в GenBank (2019))]. Вариабельные домены VH 14H3 и QDJ57937 также имеют одинаковую длину в отношении петель CDR-H1, H2. Точно так же каркасы VL 14H3 имеют высокую степень сходства последовательностей с соответствующими областями человеческого антитела ABC66914, клонированного Shriener et al. [*Vaccine* 24 (49-50), 7159-7166 (2006)]. Вариабельный домен легкой цепи антител 14H3 и ABC66914 также имеет одинаковую длину в отношении петель CDR-L1, L2 и L3. Соответственно, каркасные области и VH QDJ57937 и VL ABC66914 были выбраны в качестве акцепторных последовательностей для CDR 14H3. Модель CDR 14H3, привитых к соответствующим человеческим каркасам для VH и VL, была построена и использовалась в качестве руководства для дальнейших обратных мутаций.

Последовательности вариантов тяжелой и легкой цепей, полученные в результате процесса гуманизации антител, дополнительно выравнивали с последовательностями зародышевой линии человека с использованием инструмента IMGT Domain GapAlign для оценки степени гуманизации тяжелой и легкой цепей, как указано в руководящих принципах комитета ВОЗ по МНН. (WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review) (Internet) 2014. Доступно по адресу: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) Остатки были изменены для выравнивания с соответствующей последовательностью зародышевой линии человека, где это возможно, для повышения степени гуманизации и снижения потенциальной иммуногенности. Для гуманизованных вариантов VLv1 и VLv2 были введены мутации, чтобы сделать последовательности более похожими на ген зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37). Для гуманизованных вариантов VHv1 и VHv2 были введены мутации, чтобы сделать последовательности более похожими на ген зародышевой линии человека IGHV1-70\*04 и IGHJ4\*01 (SEQ ID NO: 254) Дополнительные версии hu14H3-VH и hu14H3-VL были сконструированы для обеспечения возможности оценки различных каркасных остатков на предмет их вклада в связывание антигена, термостабильность и иммуногенность, а также для оптимизации дезаминирования, окисления, N-гликозилирования, протеолиза и агрегации. Положения, рассматриваемые для мутации, включают те, которые

определяют канонические конформации CDR (обобщено в Martin, A.C.R. (2010) *Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains*. В: Kontermann R and Dübel S (eds). *Antibody Engineering*. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.),

находятся в зоне Вернье (Foote J and Winter G. (1992) *Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops*. *J Mol Biol.* 224(2):487-99.),

локализуются на интерфейсе домена VH/VL (обобщено в Leger OJP and Saldanha J. (2000) *Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting*. В: Shepherd P and Dean C (eds). *Monoclonal Antibodies: a Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press.),

чувствительны к посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование или пироглютаминирование,

заняты остатками, которые, как предполагается, могут конфликтовать с CDR, согласно модели CDR 14H3, привитых к каркасам VH и VL, или

заняты остатками, которые редко встречаются среди секвенированных человеческих антител, где либо остаток родительского мышинового 14H3, либо какой-либо другой остаток гораздо более распространен в репертуаре человеческих антител.

Выравнивания мышинового 14H3 и различных гуманизованных антител показаны для вариабельных областей легкой цепи (табл. 46 и фиг. 14) и вариабельных областей тяжелой цепи (табл. 45 и фиг. 13).

Были сконструированы 2 варианта вариабельной области гуманизованной тяжелой цепи и 2 варианта вариабельной области гуманизованной легкой цепи, содержащие различные перестановки замен: hu14H3VHv1 или hu14H3VHv2, (SEQ ID NO: 248-249 соответственно); и hu14H3VLv1 или hu14H3VLv2, (SEQ ID NO: 250-251, соответственно) (табл. 45 и 46). Примеры гуманизованных конструкций Vk и Vh с обратными мутациями и другими мутациями, основанными на выбранных каркасах человека, показаны в табл. 45 и 46 соответственно. Области, выделенные жирным шрифтом, в табл. 45 и 46, обозначают CDR, согласно композитному определению по Kabat/Chothia. Знак "-" в столбцах табл. 45

и 46 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO: 248-249 и SEQ ID NO: 250-251 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в табл. 47. Аминокислоты в положениях в hu14H3VHv1 и hu14H3VHv2 перечислены в табл. 48. Аминокислоты в положениях в hu14H3VLv1 и hu14H3VLv2 перечислены в табл. 49

Процентный показатель степени гуманизации для гуманизированных VH цепей hu14H3VHv1 и hu14H3VHv2 (SEQ ID NO: 248-249, соответственно) по отношению к наиболее сходному гену зародышевой линии человека IGHV1-70\*04 и IGHJ4\*01 (SEQ ID NO: 254), и для гуманизированных VL цепей hu14H3VLv1 и hu14H3VLv2 (SEQ ID NO: 250-251, соответственно) по отношению к наиболее сходному гену зародышевой линии человека IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37), показан в табл. 50.

Таблица 45

Остаток по Kabat №	Линейный остаток №	FR или CDR	VH мышиного 14H3 (SEQ ID NO:240)	IGHV2-70*04 и IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	QDJ57937VH hFrwk (SEQ ID NO:x253)	Hu4H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)
1	1	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	T	T	T	T	T
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	K	K	K	K	K
6	6	Fr1	E	E	E	E	E
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	P	P	P	P	P
10	10	Fr1	G	A	A	A	A
11	11	Fr1	I	L	L	L	L
12	12	Fr1	L	V	V	V	V

13	13	Fr1	Q	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	S	T	T	T	T
16	16	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
17	17	Fr1	T	T	T	T	T
18	18	Fr1	L	L	L	L	L
19	19	Fr1	S	T	T	T	T
20	20	Fr1	L	L	L	L	L
21	21	Fr1	T	T	T	T	T
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	S	T	T	T	T
24	24	Fr1	F	F	F	F	F
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	<b>CDR-H1</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
27	27	<b>CDR-H1</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>
28	28	<b>CDR-H1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
29	29	<b>CDR-H1</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>
30	30	<b>CDR-H1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
31	31	<b>CDR-H1</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
32	32	<b>CDR-H1</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>
33	33	<b>CDR-H1</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
34	34	<b>CDR-H1</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>
35	35	<b>CDR-H1</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
35A	36	<b>CDR-H1</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>
35B	37	<b>CDR-H1</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
36	38	Fr2	W	W	W	W	W
37	39	Fr2	I	I	I	I	I
38	40	Fr2	R	R	R	R	R
39	41	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
40	42	Fr2	P	P	P	P	P
41	43	Fr2	S	P	P	P	P
42	44	Fr2	G	G	G	G	G
43	45	Fr2	K	K	K	K	K
44	46	Fr2	G	A	A	A	A
45	47	Fr2	L	L	L	L	L
46	48	Fr2	E	E	E	E	E
47	49	Fr2	W	W	W	W	W
48	50	Fr2	L	L	L	L	L
49	51	Fr2	A	A	A	A	A
50	52	<b>CDR-H2</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
51	53	<b>CDR-H2</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>
52	54	<b>CDR-H2</b>	<b>W</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>W</b>	<b>W</b>

52A		CDR-H2	-	-	-	-	-
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-
53	55	CDR-H2	W	W	W	W	W
54	56	CDR-H2	D	D	D	D	D
55	57	CDR-H2	D	D	D	D	D
56	58	CDR-H2	I	D	D	I	I
57	59	CDR-H2	K	K	K	K	K
58	60	CDR-H2	Y	F	F	Y	Y
59	61	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y
60	62	CDR-H2	N	S	S	N	N
61	63	CDR-H2	A	T	T	A	A
62	64	CDR-H2	A	S	S	A	A
63	65	CDR-H2	L	L	L	L	L
64	66	CDR-H2	K	K	K	K	K
65	67	CDR-H2	S	T	T	S	S
66	68	Fr3	R	R	R	R	R
67	69	Fr3	L	L	L	L	L
68	70	Fr3	T	T	T	T	T
69	71	Fr3	I	I	I	I	I
70	72	Fr3	S	S	S	S	S
71	73	Fr3	K	K	K	K	K
72	74	Fr3	D	D	D	D	D
73	75	Fr3	T	T	T	T	T
74	76	Fr3	S	S	S	S	S
75	77	Fr3	K	K	K	K	K
76	78	Fr3	N	N	N	N	N
77	79	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q
78	80	Fr3	V	V	V	V	V
79	81	Fr3	F	V	V	V	V
80	82	Fr3	L	L	L	L	L
81	83	Fr3	K	T	T	T	T
82	84	Fr3	I	M	M	M	M
82A	85	Fr3	A	T	T	T	T
82B	86	Fr3	S	N	N	N	N
82C	87	Fr3	V	M	M	M	M
83	88	Fr3	D	D	D	D	D
84	89	Fr3	T	P	P	P	P
85	90	Fr3	A	V	V	V	V
86	91	Fr3	D	D	D	D	D
87	92	Fr3	T	T	T	T	T
88	93	Fr3	A	A	A	A	A

89	94	Fr3	T	T	T	T	T
90	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
91	96	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
92	97	Fr3	C	C	C	C	C
93	98	Fr3	A	A	A	A	A
94	99	Fr3	R	R	R	R	R
<b>95</b>	<b>100</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
<b>96</b>	<b>101</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>V</b>
<b>97</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>V</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>98</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>A</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>99</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>D</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>A</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100A</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>F</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100B</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100C</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100D</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100E</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100F</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100G</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100H</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100I</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100J</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>100K</b>		<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>101</b>	<b>102</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
<b>102</b>	<b>103</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>I</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>
103	104	Fr4	W	W	W	W	W
104	105	Fr4	G	G	G	G	G
105	106	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
106	107	Fr4	G	G	G	G	G
107	108	Fr4	T	T	T	T	T
108	109	Fr4	T	L	M	M	L
109	110	Fr4	L	V	V	V	V
110	111	Fr4	T	T	T	T	T
111	112	Fr4	V	V	V	V	V
112	113	Fr4	S	S	S	S	S
113	114	Fr4	S	S	L	L	S

Таблица 46

Остаток по Kabat №	Линейный остаток №	FR или CDR	VL мышного 14H3 (SEQ ID NO:244)	IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256)	Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	V	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	T	T	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	P	P	P	P	P
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	T	T	T	T
15	15	Fr1	L	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	D	E	E	E	E
18	18	Fr1	Q	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I

22	22	Fr1	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	<b>CDR-L1</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
25	25	<b>CDR-L1</b>	S	S	S	S	S
26	26	<b>CDR-L1</b>	S	S	S	S	S
27	27	<b>CDR-L1</b>	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	<b>CDR-L1</b>	S	S	S	S	S
27B	29	<b>CDR-L1</b>	L	L	L	L	L
27C	30	<b>CDR-L1</b>	V	L	L	V	V
27D	31	<b>CDR-L1</b>	H	H	H	H	H
27E	32	<b>CDR-L1</b>	S	S	S	S	S
27F		<b>CDR-L1</b>	-	-	-	-	-
28	33	<b>CDR-L1</b>	N	N	N	N	N
29	34	<b>CDR-L1</b>	G	G	G	G	G
30	35	<b>CDR-L1</b>	N	Y	Y	N	N
31	36	<b>CDR-L1</b>	T	N	N	T	T
32	37	<b>CDR-L1</b>	F	Y	Y	F	F
33	38	<b>CDR-L1</b>	L	L	L	L	L
34	39	<b>CDR-L1</b>	H	D	D	H	H
35	40	Fr2	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
37	42	Fr2	L	L	L	L	Q
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	K	K	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	K	Q	Q	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	<b>CDR-L2</b>	<b>K</b>	L	L	<b>K</b>	<b>K</b>
51	56	<b>CDR-L2</b>	<b>V</b>	G	G	<b>V</b>	<b>V</b>
52	57	<b>CDR-L2</b>	S	S	S	S	S
53	58	<b>CDR-L2</b>	N	N	N	N	N
54	59	<b>CDR-L2</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
55	60	<b>CDR-L2</b>	<b>F</b>	A	A	<b>F</b>	<b>F</b>
56	61	<b>CDR-L2</b>	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G

58	63	Fr3	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	K	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	L	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	F	Y	Y	F	F
88	93	Fr3	C	C	C	C	C
89	94	<b>CDR-L3</b>	<b>S</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
90	95	<b>CDR-L3</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>
91	96	<b>CDR-L3</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
92	97	<b>CDR-L3</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
93	98	<b>CDR-L3</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>L</b>	<b>L</b>
94	99	<b>CDR-L3</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>V</b>
95	100	<b>CDR-L3</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
95A		<b>CDR-L3</b>	-	-	L	-	-
95B		<b>CDR-L3</b>	-	-	T	-	-
95C		<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-	-
95D		<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-	-

95E		CDR-L3	-	-	-	-	-
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	W	Y	L	W	W
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	Q	G	G	Q
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	L	V	V	L
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	I	I	I	I
106A		Fr4	-	-	-	-	-
107	112	Fr4	K	K	K	K	K

Таблица 47. Обратные мутации V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> и другие мутации для гуманизованного 14H3

Вариант V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Последовательность акцептора экзона V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Изменения акцепторных каркасных остатков (или CDR) (на основе композитных определений CDR по Kabat/Chothia)
Hu14H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	Номер доступа в GenBank QDJ57937VH_hFrwk (SEQ ID NO:253) IGHV2-70*04 и IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	H35B
Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)	Номер доступа в GenBank QDJ57937VH_hFrwk (SEQ ID NO:253) IGHV2-70*04 и IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	H35B, H108, H113
Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	Номер доступа в GenBank ABC66914VL_hFrwk (SEQ ID NO:256)	L2, L87
Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)	Номер доступа в GenBank ABC66914VL_hFrwk (SEQ ID NO:256) IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L2, L7, L37, L87, L100, L104

Таблица 48. Нумерация по Kabat каркасных остатков (или CDR) (на основе CDR согласно композитному определению Kabat/Chothia) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 14H3

Остаток	QDJ57937VH hFwk (SEQ ID NO:253)	IGHV2-70*04 и IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	VH мышинного 14H3 (SEQ ID NO:240)	Hu14H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)
H35B	S	S	G	S	S
H108	M	L	T	M	L
H113	L	S	S	L	S

Таблица 49. Нумерация по Kabat каркасных остатков (на основе CDR согласно композитному определению Kabat/Chothia) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 14H3

Остаток	ABC6674VL hFwk (SEQ ID NO:256)	IGKV2-28*01 и IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	VL мышинного 14H3 (SEQ ID NO:x244)	Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)
L2	I	I	V	V	V
L7	T	S	T	T	S
L37	L	L	L	L	Q
L87	Y	Y	F	F	F
L100	G	Q	G	G	Q
L104	V	L	L	V	L

Таблица 50. Процентный показатель степени гуманизации тяжелых и легких цепей гуманизированных антител 14H3

Вариант V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Степень
Hu14H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	89,9%
Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)	89,9%
Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	85,0 %
Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)	85,0 %

Положения, в которых канонические, верньерные или интерфейсные остатки различаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами на замену. Примеры взаимодействующих канонических остатков/остатков CDR включают остаток по Kabat L2 в табл. 46. Примеры верньерными остатков включают остаток по Kabat L2 в табл. 46. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остаток по Kabat L87 в табл. 46.

Обоснования выбора положений, указанных в табл. 45, в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов на замену являются следующими:

вариабельные области тяжелой цепи hu14H3VHv1

состоит из петель CDR-H1, H2 и H3 14H3-VH, привитых на каркас QDJ57937-VH. Кроме того, содержит замену G35bS в CDR-H1

G35bS: представляет собой мутацию остатка CDR. Предполагается, что остаток в положении H35b не находится в прямом контакте с антигеном, исходя из модели. Ген зародышевой линии человекаIGHV1-70\*04 иIGHJ4\*01 (SEQ ID NO: 254) имеет Ser в этом положении. L35bS представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию.

hu14H3VHv2

возвращает все каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье, или локализуются на интерфейсе доменов VH/VL или способствуют структурной стабильности. hu14H3VHv2 включает обратные мутации или замены в различных положениях, перечисленных ниже, что позволяет оценить вклад этих положений в антигенсвязывающую аффинность и иммуногенность;

возвращает все каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье, или локализуются на интерфейсе доменов VH/VL или способствуют структурной стабильности. hu14H3VHv2 включает обратные мутации или замены в различных положениях, перечисленных ниже, что позволяет оценить вклад этих положений в антигенсвязывающую аффинность и иммуногенность. Кроме того, включает обратные мутации или замену на наиболее часто встречающийся остаток в указанном положении.

M108L: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Leu находится в гене зародышевой линии человекаIGHV1-70\*04 иIGHJ4\*01 (SEQ ID NO: 254) в этом положении.

L113S: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Ser находится в гене зародышевой линии человекаIGHV1-70\*04 иIGHJ4\*01 (SEQ ID NO: 254) в этом положении.

Обоснования выбора положений, указанных в табл. 46, в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов на замену являются следующими:

варибельные области легкой каппа-цепи

hu14H3VLv1

состоит из петель CDR-L1, L2 и L3 14H3-VL, привитых на каркас VL ABC66914. Кроме того, hu14H3VLv1 также возвращает все каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье или локализуются в интерфейсе домена VH/VL, способствуют структурной стабильности.

I2V: представляет собой обратную мутацию остатка канонической структуры по Chothia с целью сохранения канонической структуры.

Y87F: представляет собой обратную мутацию остатка интерфейса VH/VL, с целью сохранения интерфейса тяжелая цепь: легкая цепь.

hu14H3VLv2

Сохраняет все возвращенные каркасные замены в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Chothia, являются частью зоны Вернье или размещается в интерфейсе домена VH/VL. Кроме того, hu14H3VLv2 включает в себя обратные мутации или замену на наиболее часто встречающийся остаток в данном положении, что повышает реализуемость антитела. Мутации в hu14H3VLv2, которые не включены в hu14H3VLv1:

T7S: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Ser находится в гене зародышевой линии человекаIGKV2-28\*01 иIGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

L37Q: Leu в этом положении является иммуногенным, поэтому для снижения иммуногенности его заменяют на Gln. L37Q также представляет собой частотную мутацию. Gln представляет собой наиболее часто встречающийся остаток в этом положении.

G100Q: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Gln находится в гене зародышевой линии человекаIGKV2-28\*01 иIGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

V104L: представляет собой мутацию, выравнивающую зародышевую линию. Leu находится в гене зародышевой линии человекаIGKV2-28\*01 иIGKJ2\*01 (SEQ ID NO: 37) в этом положении.

На основе этих человеческих каркасов были разработаны следующие варианты: варибельные области тяжелой цепи

>hu14H3VHv1

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVSIRQPPGKALEWLANIWDDIK  
YYNAALKSRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCARNVDYWGQGTMTVTVSL

>hu14H3VHv2

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVSIRQPPGKALEWLANIWDDIK  
YYNAALKSRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCARNVDYWGQGLTVTVSS

варибельные области легкой каппа-цепи

&gt;hu14H3VL v1

DVVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNR  
SGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTLVPWTFGGGKVEIK

&gt;hu14H3VLv2

DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQKPGQSPQLLIYKVSNR  
SGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTLVPWTFGGGKLEIK

Гуманизированные последовательности генерируют с использованием протокола двухэтапной ПЦР, который позволяет вводить множественные мутации, делеции и вставки с использованием сайт-направленного мутагенеза QuikChange [Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) *BioTechniques* 26:680-682].

Пример 13. Мышиное антитело 9F5, мышиное антитело 10C12, мышиное антитело 12C4 и мышиное антитело 2D11 предотвращают токсичность тау в первичных нейронах.

Нейроны коры головного мозга по состоянию на 16-17-й день эмбрионального развития были получены из плодов мышей линии C57B16/J, как описано в Pillot et al., 1999; Kriem et al., 2005; and Garcia et al., 2010. Вкратце, диссоциированные клетки коры головного мозга высевали в 48-луночные планшеты (50 000 клеток/лунку), предварительно покрытые 1,5 мкг/мл полиорнитина (Sigma). Клетки культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко/P12, не содержащей сыворотки, и с добавлением гормонов, белков и солей. Культуры хранили при температуре 35°C в увлажненной с применением 6% CO<sub>2</sub> атмосфере.

Все обработки проводили в трех повторностях в дни 6-7 *in vitro* (DIV). Нейроны инкубировали либо с носителем, либо с олигомерами тау человека (конечная концентрация 1 мкМ на основе мономеров) в присутствии 5 возрастающих концентраций указанного антитела в течение 24 ч и в конечном объеме 140 мкл на лунку.

После инкубации жизнеспособность нейронов измеряли с использованием бромида 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия (МТТ) с применением опубликованных протоколов (например, Mosmann et al., 1983). Клетки инкубировали при 35°C в течение 1 ч с использованием МТТ. Для этого МТТ солибилизировали в ФСБ в концентрации 5 мг/мл. В каждую лунку добавляли 14 мкл раствора МТТ. После инкубации среду удаляли, а клетки лизировали с применением 150 мкл ДМСО в течение 10 мин в защищенном от света месте. После полной солибилизации продукта формазана определяли оптическую плотность при 570 нм. Жизнеспособность в контроле носителем была определена как 100%. Данные были выражены как % жизнеспособности в контроле носителем. Результаты представлены в табл. 57 и на фиг. 16.

Таблица 57. Анализ МТТ с использованием 9F5, 10C12, 2D11 и 12C4

Все значения показывают жизнеспособность клеток (% контроля клеток, не обработанных тау-олигомерами) ± СО				
	9F5	10C12	2D11	12C4
Количество антитела (молярные эквив.)				
5	93,1±1,5	86,8±1,7	92,2±1,1	81,1±4,5
3	92,6±3,4	69,2±3	64±3,6	78,7±2,1
1	64,9±4,5	56,4±2,6	50,9±2,4	62,3±2,9
0,33	58±2,6	51,3±2,4	59,5±2,3	53,2±4,5
0,2	47,4±1,6	47,1±2,1	52,8±1,1	48,6±2,1
0	48,9±2,8	48,9±1,9	50,9±2,6	50,9±3,4

Все четыре антитела продемонстрировали способность защищать нейроны от токсичности, индуцированной тау. Было отмечено, что 9F5 продемонстрировал более высокую активность со способностью полностью ингибировать токсичность при более низкой концентрации, чем другие антитела.

Высвобождение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) является индикатором гибели клеток. Снижение уровня ЛДГ указывает на пониженную гибель клеток в результате снижения интернализации тау. Для измерения высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) культуральную среду (110 мкл) из каждой лунки переносили в пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл и заменяли свежей средой для анализа МТТ. Собранную среду центрифугировали при 800 g в течение 5 мин и супернатант (100 мкл бесклеточной культуральной среды) переносили в 48-луночный планшет, который хранили при температуре 4°C в защищенном от света месте для дальнейшего анализа. Количественное определение ЛДГ в культуральной среде проводили в соответствии с рекомендациями производителя (набор для определения цитотоксичности [ЛДГ], арт. компании Roche 11 644 793 001). Результаты представлены в табл. 58 и на фиг. 17.

Таблица 58. Анализ ЛДГ с использованием 9F5, 10C12, 2D11 и 12C4

Все значения показывают высвобождение ЛДГ (% контроля клеток, не обработанных тау-олигомерами) $\pm$ СО				
	9F5	10C12	2D11	12C4
Количество антитела (молярные эквив.)				
5	91,4 $\pm$ 5,1	95,1 $\pm$ 3,9	115,4 $\pm$ 4,5	108,2 $\pm$ 5,2
3	95,9 $\pm$ 2,9	101,1 $\pm$ 5,8	109 $\pm$ 3,8	109,9 $\pm$ 8,2
1	116,0 $\pm$ 2,6	109 $\pm$ 1,1	131,1 $\pm$ 3,3	123,7 $\pm$ 7,5
0,33	151,5 $\pm$ 5,9	128,6 $\pm$ 7,6	147,7 $\pm$ 5,3	151,9 $\pm$ 7,1
0,2	155,4 $\pm$ 3,8	140 $\pm$ 2,7	177 $\pm$ 3,0	153,4 $\pm$ 10,3
0	158,1 $\pm$ 4,5	145,1 $\pm$ 3,9	159,4 $\pm$ 7,8	160,1 $\pm$ 4,1

Все четыре антитела продемонстрировали способность защищать нейроны от токсичности, индуцированной тау. Было отмечено, что 9F5 продемонстрировал более высокую активность со способностью полностью ингибировать токсичность при более низкой концентрации, чем другие антитела, и даже снижал высвобождение ЛДГ до значений ниже исходного уровня при самой высокой добавленной концентрации.

#### Ссылки

Pillot, T., Drouet, B., Queille, S., et al.: The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J Neurochem.* 73(4): 1626-34 (1999).

Kriem, B., Sponne, I, Fifre, A., et al.: Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide. *FASEB J.* 19(1):85-7 (2005).

Garcia, P., Youssef, I, Utvik, J.K., et al.: Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 30(22): 7516-27 (2010).

Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, 65, 55-63 (1983).

Пример 14. Анализ поверхностного плазмонного резонанса (ППР) мышинового антитела 9F5, мышинового антитела 10C12, мышинового антитела 14H3, мышинового антитела 17C12, мышинового антитела 2D11 и мышинового антитела 12C4

Анализ поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием Biacore выполняли путем иммобилизации антимышиного антитела (GE Lifesciences) на чипе CM3 с помощью EDC/NHS. Затем антитела захватывали на антимышиную поверхность до эквивалентных уровней. Регенерацию проводили посредством 2 инъекций 10 мМ глицина с рН 1,7 продолжительностью 30 с. Различные концентрации в диапазоне от 500 до 0,122 нМ, разведенного в 3-кратных разведениях, рекомбинантного тау человека 4R0N пропускали через датчик в течение 150-секундной фазы ассоциации и 300-секундной фазы диссоциации. Из данных были вычтены значения холостой пробы как для нерелевантного датчика, не содержащего тестируемого антитела, чтобы учесть нерелевантное связывание с подготовленной поверхностью датчика, так и для носителя с подвижной фазой, чтобы учесть диссоциацию тестируемого антитела от захвата антимышиного антитела. Затем данные были проанализированы с помощью встроенного программного обеспечения для оценки с использованием общей подгонки 1:1. Результаты представлены в табл. 51. Все антитела продемонстрировали схожую кинетику связывания со значениями Kd в пределах 200 пМ друг от друга; профили кинетики характеризовались фазами быстрой ассоциации и медленной диссоциации.

Таблица 51. Параметры кинетики мышинового антитела 9F5, мышинового антитела 10C12, мышинового антитела 14H3, мышинового антитела 17C12, мышинового антитела 2D11 и мышинового антитела 12C4

Антитело	$k_a$ ( $M^{-1} c^{-1}$ )	$k_d$ ( $c^{-1}$ )	$K_d$ (M)
9F5	6.39e+6	2.24e-3	3.50e-10
10C12	6.53e+6	2.45e-3	3.75e-10
14H3	7.60e+6	1.53e-3	2.02e-10
17C12	4.03e+6	1.94e-3	4.82e-10
2D11	6.93e+6	2.21e-3	3.18e-10
12C4	5.69e+6	2.06e-3	3.63e-10

Пример 15. Мышиное антитело 9F5, мышинное антитело 10C12, мышинное антитело 14H3, мышинное антитело 17C12, мышинное антитело 2D11 и мышинное антитело 12C4 обнаруживают тау в образцах, полученных от пациентов с болезнью Альцгеймера: анализ методом вестерн-блоттинга

Свежезамороженные образцы из лобной доли коры головного мозга были получены из головного мозга одного здорового контроля (ЗК) и четырех пациентов с болезнью Альцгеймера (БА). Образцы гомогенизировали в 10 объемах буфера RIPA, содержащего ингибиторы протеаз, и центрифугировали в течение 15 мин при  $16\ 000 \times g$  при температуре  $4^\circ C$ . Супернатанты были удалены для получения растворимой фракции. Пеллеты ресуспендировали в  $1 \times$ ФСБ, содержащем 1% саркозил и гомогенизировали. Саркозилные гомогенаты центрифугировали в течение 60 мин при  $100\ 000 \times g$  при температуре  $4^\circ C$ , а супернатанты и пеллеты были разделены. Гранулы ресуспендировали в одном объеме 2% SDS для получения нерастворимой фракции. Полученные растворимые и нерастворимые фракции разделяли методом ДСН-ПААГ-электрофореза, и подвергали иммуноблоттингу с указанными антителами в концентрации 0,5 мкг/мл, промывали и зондировали козьими антимышиными вторичными антителами, конъюгированными с IRDye-800 (LiCor). После промывки блоты сканировали с помощью сканера LiCor. Результаты представлены на фиг. 18. Все антитела специфически выявляли тау, содержащийся в нерастворимых фракциях, полученных от пациентов с БА, и в разной степени выявляли тау в растворимых фракциях.

Пример 16. Анализ иммунопреципитации нерастворимого экстракта, полученного от пациента с болезнью Альцгеймера, с помощью мышинового антитела 9F5, мышинового антитела 10C12, мышинового антитела 14H3, мышинового антитела 17C12, мышинового антитела 2D11 и мышинового антитела 12C4

Для проверки способности антител захватывать агрегаты тау, нерастворимую в саркозиле фракцию, полученную от одного пациента с болезнью Альцгеймера (БА) и одного нормального контроля инкубировали с указанными антителами. Магнитные шарики, конъюгированные с козьими антимышиными антителами (Life Technologies), добавляли к смеси экстракта с антителами для захвата комплексов антитело/антиген. Шарики тщательно промывали, кипятили в буфере для ДСН-ПААГ-электрофореза, содержащем ДТТ, а затем шарики удаляли. Полученные фракции разделяли методом ДСН-ПААГ-электрофореза и подвергали иммуноблоттингу с применением поликлонального антитела K9JA для обнаружения всех иммунозахваченных видов тау. Результаты представлены на фиг. 19. Чередующиеся полосы представляют собой иммунопреципитаты из экстрактов нормальной ткани и ткани БА. Маркеры молекулярной массы указываются слева. Все антитела в разной степени захватывали нерастворимый тау, полученный от пациентов с БА, и продемонстрировали способность захватывать крупные нерастворимые агрегаты с высокой массой. Из протестированных антител 9F5, 2D11, 17C12, 10C12 и 12C4 показали схожие профили, с сильной иммунореактивностью, присутствующей в диапазоне 50-60 кДа, а также в концентрирующем геля. Захват 14H3 также выявил аналогичные, хотя и менее многочисленные, виды тау. Эти данные показывают, что все протестированные антитела способны связывать аналогичный массив форм тау.

Пример 17. Способность гуманизированных вариантов 9F5 выдерживать стресс при перемешивании

Характеристики реализуемости гуманизированных вариантов 9F5 были проверены на их способность противостоять агрегации, вызванной стрессом при перемешивании.

Антитела заменяли буфером в гистидиновом буфере (25 мМ гистидин, pH 6) в концентрации 1 мг/мл и перемешивали при 1500 об/мин при комнатной температуре в течение 48 ч. Образцы отбирали через 0, 24 и 48 ч, фильтровали через 0,22-микронный фильтр и анализировали методом аналитической эксклюзионной хроматографии (ЭХ). Для каждого антитела общая площадь основных пиков для каждой временной точки была нормализована к площади основного пика при  $t=0$  ч, и антитела были ранжированы на основе потери антитела до агрегации с течением времени. Результаты представлены на фиг. 20 и в

табл. 52. Сокращения наименований гуманизированных вариантов 9F5, используемых на фиг. 20 соответствуют описанию, приведенному во втором столбце табл. 52. Хотя ни одна точечная мутация не может служить причиной чувствительности к стрессу при перемешивании, некоторые комбинации мутаций приводят к отсутствию устойчивости. Следует отметить, что комбинации L27cG/L37G/M51G/L54R/L92I (DIM11), L27cS/L37G/M51GL54T (DIM17) и L27cG/L37Q/M51G/L54R (DIM5) приводят к повышению чувствительности к перемешиванию, в то время как комбинации, например, L27cS/L37Q/M51G/L54R (DIM2), L27cG/L37G/M51G/L54T (DIM14) и L27cG/L37G/M51G/L54R (DIM13) приводят к устойчивости к стрессу при перемешивании. Эти результаты свидетельствуют о создании специфических комбинаций остатков в гуманизированных вариантах, которые с особой вероятностью выдержат жесткие условия производства, обработки и транспортировки.

Таблица 52. Способность гуманизированных вариантов 9F5 выдерживать стресс при перемешивании

Ранг	Гуманизированный вариант 9F5	Мономер при встряхивании в течение 24 ч (% t=0)	Мономер при встряхивании в течение 48 ч (% t=0)
1	DIM2 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM2 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 133]	100,6	103,3
2	DIM14 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM14 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 145]	100,1	107,1
3	DIM13 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM13 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 144]	105,8	105,2
4	DIM7 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM7]	102,3	105

	SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 138]		
5	DIM6 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM6 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:137]	98,8	104,6
6	DIM12 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM12 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 143]	98,2	103,8
7	DIM18 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM18 SEQ ID NO: 127 / SEQ ID NO: 149]	100,3	101,3
8	DIM30 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM30 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 161]	100	101,2
9	DIM8 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM8 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 139]	98,8	100,1
10	DIM28 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM28 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 159]	97,1	99,5
11	DIM29 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM29 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:160]	97,2	98,2
12	DIM27 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM27 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 158]	97,1	95,2
13	DIM5 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM5 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:136]	93,1	93,9
14	DIM17 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM17 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 148]	97,1	91,6
15	H10L9-DIM11 [hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM11 SEQ ID NO: 128/ SEQ ID NO: 168]	96,6	85,8
16	DIM11 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM11 SEQ ID NO: 127 / SEQ ID NO: 142]	97,4	82,4

Пример 18. Способность гуманизированных вариантов 9F5 выдерживать стресс, вызванный низким уровнем pH

Характеристики реализуемости гуманизированных вариантов 9F5 были проверены на их способность выдерживать воздействие низкого уровня pH, как это происходит на этапах инактивации вирусов в процессе производства. Антитела заменяли буфером в ацетатном буфере (10 мМ ацетат, pH 3) в концентрации 1 мг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 6 ч. Образцы отбирали через 0, 2 и 6 ч, фильтровали через 0,22-микронный фильтр и анализировали методом аналитической эксклюзионной хроматографии (ЭХ). Для каждого антитела общая площадь основных пиков для каждой временной точки была нормализована к площади основного пика при t=0 ч, и антитела были ранжированы на основе потери антитела до агрегации с течением времени. Результаты представлены на фиг. 21 и в табл. 53. Сокращения наименований гуманизированных вариантов 9F5, используемых на фиг. 21 соответствуют описанию, приведенному во втором столбце табл. 53. Комбинации L27cG/L37G/M51G/L54R/L92I (DIM11), L27cG/L37Q/M51G/L54R (DIM5) и L27cG/L37G/M51G/L54T (DIM14) приводят к повышению чувствительности к стрессу, вызванному низким уровнем pH, о чем свидетельствует снижение на >5% пика мономера через 6 ч, в то время как комбинации, например, L27cS/L37Q/M51G/L54R (DIM2), L27cD/L37Q/M51G/L54R (DIM6) и L27cG/L37G/M51G/L54R (DIM13) приводят к устойчивости к стрессу, вызванному низким уровнем pH. Следует отметить, что включение мутации L27cD привело к появлению вариантов DIM18, DIM6 и DIM7, устойчивых к низкому уровню pH. Эти результаты свидетельствуют о создании специфических комбинаций остатков в гуманизированных вариантах, которые с особой вероятностью выдержат жесткие условия производства, в частности, включение инкубации при низком pH, обычно проводимой в процессе очистки.

Таблица 53. Способность гуманизированных вариантов 9F5 выдерживать стресс, вызванный низким уровнем pH

Ранг	Вариант h9F5	Мономер через 2ч воздействия pH 3 (% t=0)	Мономер через 6ч воздействия pH 3 (% t=0)
1	DIM6 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM6 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:137]	100,8	100,6
2	DIM2 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM2 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 133]	100,6	99,6
3	DIM13 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_D]IM13 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 144	97,4	99,3
4	DIM8 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM8 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 139]	99,2	99,2
5	DIM7 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM7 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 138]	99,6	98,9
6	DIM28 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM28 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 159]	99,1	98,9
7	DIM17 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM17 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 148]	96,5	97
8	DIM18 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM18 SEQ ID NO: 127 / SEQ ID NO: 149]	97,2	96,5
9	DIM30 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM30 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 161]	96,5	96,3
10	DIM11 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM11 SEQ ID NO: 127 / SEQ ID NO: 142]	93,6	94,5
11	DIM29 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM29 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:160]	94,0	93,6
12	DIM12 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM12 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 143]	93,9	93,3
13	DIM14 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM14 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 145]	93,5	89,6
14	DIM5 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM5 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:136]	93,6	89,2
15	H10L9-DIM11 [hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM11 SEQ ID NO: 128/ SEQ ID NO: 168]	93,2	83,3
16	DIM27 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM27 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 158]	91,3	68,4

Пример 19. Осаждение ПЭГ вариантами 9F5

Осаждение ПЭГ использовали для определения относительной склонности различных гуманизированных вариантов 9F5 к агрегации в смоделированных условиях высокой концентрации. Антитела заменяли буфером в гистициновом буфере (25 мМ гистидин, pH 6) и добавляли в микропланшет, содержащий указанное количество ПЭГ6000 до конечной концентрации белка 1 мг/мл, и инкубировали при комнат-

ной температуре в течение 1 ч. После инкубации мутность измерялась при поглощении 350 нм. Результаты представлены в табл. 59-60 и на фиг. 22.

Таблица 59. Осаждение ПЭГ вариантов 9F5 DIM2, DIM13, DIM7, DIM6, DIM18, DIM8, DIM17 и DIM28

PEG6000 %	DIM2	DIM13	DIM7	DIM6	DIM18	DIM8	DIM17	DIM28
25	0,7784	0,7944	0,8912	0,7688	0,901	0,8085	0,811	0,733
20	0,7904	0,8737	0,7454	0,8063	0,8743	0,9733	1,001	0,842
15	0,4729	0,5612	0,3895	0,5658	0,6362	0,6438	0,7885	0,4952
12	0,1578	0,1952	0,1563	0,2206	0,2022	0,1592	0,3472	0,1586
10	0,1554	0,1582	0,1512	0,1541	0,1541	0,1538	0,1582	0,1583
8	0,1607	0,1546	0,15	0,15	0,1508	0,1506	0,1556	0,1591
6	0,1538	0,1519	0,1486	0,1564	0,1494	0,1502	0,1541	0,157
4	0,1526	0,1516	0,1526	0,1479	0,1462	0,1504	0,1513	0,1587
2	0,1495	0,1511	0,1523	0,148	0,1467	0,1478	0,1497	0,1518
0	0,1464	0,1481	0,1501	0,1458	0,1451	0,1471	0,1477	0,1496

Таблица 60. Осаждение ПЭГ вариантов 9F5 DIM29, DIM14, DIM30, DIM27, DIM11, H10L9DIM11, DIM5 и DIM12

PEG6000 %	DIM29	DIM14	DIM30	DIM27	DIM11	H10L9DIM11	DIM5	DIM12
25	0,7422	0,8867	0,7759	0,8138	0,8785	0,7122	0,7042	0,7078
20	0,8623	1,0284	0,8549	0,732	0,8999	0,8663	0,8869	0,8767
15	0,4642	1,0377	0,598	0,1843	0,6288	0,5383	0,5228	0,6414
12	0,1564	0,8123	0,1752	0,1536	0,1802	0,1755	0,1652	0,2092
10	0,1539	0,3975	0,1545	0,1525	0,1522	0,1575	0,1548	0,159
8	0,1542	0,1564	0,1475	0,1532	0,1514	0,1535	0,1549	0,1572
6	0,1518	0,1505	0,1492	0,1497	0,1486	0,1503	0,157	0,1559
4	0,1494	0,1496	0,1483	0,1469	0,1484	0,149	0,1523	0,153
2	0,1475	0,1485	0,1473	0,1469	0,1485	0,1482	0,1507	0,1526
0	0,1482	0,1537	0,1499	0,148	0,1484	0,1465	0,1487	0,149

Сокращения наименований гуманизированных вариантов 9F5, используемых в табл. 59-60 и на фиг. 22 соответствуют описанию, приведенному во втором столбце табл. 53. Антитела были качественно ранжированы по концентрации ПЭГ6000, которая вызывала наступление помутнения. DIM14 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM14; SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 145] и DIM17 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM17; SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 148] проявляли агрегацию при более низкой концентрации ПЭГ6000 по сравнению с большинством антител, а DIM27 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8\_DIM27; SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 158] проявляли агрегацию при более высокой концентрации ПЭГ6000 по сравнению с большинством антител. Комбинации L27cG/L37G/M51G/L54T/L92I (DIM14) и L27cS/L37G/M51G/L54T (DIM17) приводили к снижению растворимости в присутствии возрастающего количества ПЭГ6000, о чем свидетельствует более раннее наступление помутнения. Напротив, комбинация L37Q/M51G/L54R в сочетании с исходным лейцином в положении L27c (DIM27) приводит к увеличению растворимости в присутствии возрастающего количества ПЭГ6000. Эти результаты свидетельствуют о создании специфических комбинаций остатков в гуманизированных вариантах, которые с особой вероятностью выдержат составление при высоких концентрациях антител, как правило, необходимых для клинического применения.

Пример 20. Иммуногистохимический анализ образцов головного мозга человека с использованием контроля, мышиноного 2D11, мышиноного 9F5, мышиноного 12C4, мышиноного 14H3 и мышиноного 17C12.

Свежезамороженные образцы головного мозга человека были помещены в ОСТ и разрезаны с использованием криостата для получения срезов размером 10 мкм. Срезы фиксировали на предметных стеклах с помощью 10% нейтрального забуференного формалина в течение 10 мин при 4°C и обрабатывали глюкозооксидазой для блокирования эндогенных пероксидаз. Срезы окрашивали указанными первичными антителами с помощью системы BOND Polymer Refine Detection (Leica), содержащей хромоген DAB и гематоксилиновый контраст. Затем срезы дегидратировали в возрастающей серии концентраций этанола и ксилола перед покрытием. Результаты показаны на фиг. 23A-F. Как и ожидалось, неиммунное

контрольное антитело практически не связывалось ни с нормальным контролем, ни с образцами, полученными от пациентов с болезнью Альцгеймера, при обеих исследуемых концентрациях. Напротив, антитела к МТВР продемонстрировали обильное связывание с патологическими признаками, присутствующими при болезни Альцгеймера, включая дистрофические нейриты и нейрофибриллярные клубки. Это связывание продемонстрировало зависимость от дозы, причем более сильное связывание наблюдалось при более высоких концентрациях антител. Подмножество антител показало незначительное связывание с нормальными контрольными срезами, в частности 9F5, 12C4 и 17C12. 14H3 и 2D11 показали связывание с нормальной контрольной тканью, что указывает на едва уловимые различия в специфичности по отношению к тау, присутствующему в этих образцах. Для 14H3 меньшая селективность в отношении БА по сравнению с контрольными образцами отражает разницу в иммунореактивности, обнаруженной в экспериментах иммунопреципитации, что указывает на то, что это антитело связывает нормальные формы тау в большей степени, чем 2D11, 9F5, 12C4 и 17C12.

Пример 21. Примеры CDR

Примеры CDR антител по изобретению приведены в табл. 54.

Таблица 54. Примеры CDR

CDR и определение	Аминокислотная последовательности CDR	SEQ ID NO:	Примеры VH или VL, в которых присутствует CDR
CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat/Chothia	GFNIKDDYMN	8	VH мышинного 9F5
CDR-H2 по Kabat	WIDPENGDEYASKFQG	9	VH мышинного 9F5
CDR-H3 по Kabat	SNG	10	VH мышинного 9F5
CDR-L1 по Kabat	RSSKSLLSNGITYLY	12	VL мышинного 9F5
CDR-L2 по Kabat	QMSNLAS	13	VL мышинного 9F5
CDR-L3 по Kabat	AQNLELPLT	14	VL мышинного 9F5
CDR-H1 по Kabat	DDYMN	40	VH мышинного 9F5
CDR-H1 по Chothia	GFNIKDD	41	VH мышинного 9F5
CDR-H2 по Chothia	DPENGD	42	VH мышинного 9F5
CDR-H2 по AbM	WIDPENGDE	43	VH мышинного 9F5
CDR-H1 по Contact	KDDYMN	44	VH мышинного 9F5
CDR-H2 по Contact	WIGWIDPENGDE	45	VH мышинного 9F5
CDR-H3 по Contact	TTSN	46	VH мышинного 9F5
CDR-L1 по Contact	ITYLYWY	47	VL мышинного 9F5
CDR-L2 по Contact	LLIQMSNLA	48	VL мышинного 9F5
CDR-L3 по Contact	AQNLELPL	49	VL мышинного 9F5

CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia		GFTIKDDYMN	50	hu9F5VHv4, hu9F5VHv5 и hu9F5VHv6
CDR-H2 Kabat	по	WVDPEDGETEYASKFQG	51	hu9F5VHv5, hu9F5VHv6 и hu9F5VHv7
CDR-H2 Kabat	по	WVDPENDTEYASKFQG	52	hu9F5VHv8
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLSNGITYLY	53	hu9F5VLv5 и hu9F5VLv6
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLSNGINYLY	54	hu9F5VLv7
CDR-L2 Kabat	по	QGSNRAS	55	hu9F5VLv4, hu9F5VLv5, hu9F5VLv6, hu9F5VLv7, SEQ ID NO:133, 135, 136, 137, 142, 143, 144, 149, 158, 159, 163, 164, 165, 168, 169
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSDLHSNGITYLY	172	hu9F5VLv2_L27bD, SEQ ID NO:71
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSTLHSNGITYLY	173	hu9F5VLv2_L27bT, SEQ ID NO:79
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSQLHSNGITYLY	174	hu9F5VLv2_L27bQ, SEQ ID NO:81
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLDHSNGITYLY	175	hu9F5VLv2_L27cD, SEQ ID NO:63, hu9F5VLv8_DIM6, SEQ ID NO:137, hu9F5VLv8_DIM7, SEQ ID NO:138 и hu9F5VLv8_DIM18, SEQ ID NO:149

CDR-L1 Kabat	no	RSSKSLGHSNGITYLY	176	<p>hu9F5VLv2_L27cG, SEQ ID  NO:64, hu9F5VLv8_DIM5, SEQ ID  NO:136, hu9F5VLv8_DIM8, SEQ  ID NO:139, hu9F5VLv8_DIM9,  SEQ ID NO:140,  hu9F5VLv8_DIM11, SEQ ID  NO:142, hu9F5VLv8_DIM12, SEQ  ID NO:143, hu9F5VLv8_DIM13,  SEQ ID NO:144,  hu9F5VLv8_DIM14, SEQ ID  NO:145, hu9F5VLv8_DIM15, SEQ  ID NO:146, hu9F5VLv8_DIM16,  SEQ ID NO:147,  hu9F5VLv8_DIM23, SEQ ID  NO:154, hu9F5VLv8_DIM24, SEQ  ID NO:155, hu9F5VLv8_DIM25,  SEQ ID NO:156,  hu9F5VLv9_DIM5, SEQ ID  NO:165, hu9F5VLv9_DIM8, SEQ  ID NO:166, hu9F5VLv9_DIM11,  SEQ ID NO:168 и  hu9F5VLv9_DIM13, SEQ ID  NO:169</p>
-----------------	----	------------------	-----	--

CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLSHSNGITYLY	177	hu9F5VLv2_L27cS, SEQ ID NO:65, hu9F5VLv8_DIM1, SEQ ID NO:132, hu9F5VLv8_DIM2, SEQ ID NO:133, hu9F5VLv8_DIM3, SEQ ID NO:134, hu9F5VLv8_DIM4, SEQ ID NO:135, hu9F5VLv8_DIM10, SEQ ID NO:141, hu9F5VLv8_DIM17, SEQ ID NO:148, hu9F5VLv8_DIM19, SEQ ID NO:150, hu9F5VLv8_DIM20, SEQ ID NO:151, hu9F5VLv8_DIM21, SEQ ID NO:152, hu9F5VLv8_DIM22, SEQ ID NO:153, hu9F5VLv8_DIM28, SEQ ID NO:159, hu9F5VLv8_DIM29, SEQ ID NO:160, hu9F5VLv8_DIM30, SEQ ID NO:161, hu9F5VLv9_DIM1, SEQ ID NO:162, hu9F5VLv9_DIM2, SEQ ID NO:163, hu9F5VLv9_DIM4, SEQ ID NO:164, hu9F5VLv9_DIM10, SEQ ID NO:167, hu9F5VLv9_DIM19, SEQ ID NO:170 и hu9F5VLv9_DIM20, SEQ ID NO:171
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLEHSNGITYLY	178	hu9F5VLv2_L27cE, SEQ ID NO:66
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLTHSNGITYLY	179	hu9F5VLv2_L27cT, SEQ ID NO:69

CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLNHSNGITYLY	180	hu9F5VLv2_L27cN, SEQ ID NO:70
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLAHSNGITYLY	181	hu9F5VLv2_L27cA, SEQ ID NO:74
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLPHSNGITYLY	182	hu9F5VLv2_L27cP, SEQ ID NO:83
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLIHSNGITYLY	183	hu9F5VLv8_DIM26, SEQ ID NO:157
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLHSNGETYLY	184	hu9F5VLv2_I30E, SEQ ID NO:67
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLHSNGKTYLY	185	hu9F5VLv2_I30K, SEQ ID NO:68
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLHSNGGTYLY	186	hu9F5VLv2_I30G, SEQ ID NO:72
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLHSNGQTYLY	187	hu9F5VLv2_I30Q, SEQ ID NO:78
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLHSNGIGYLY	188	hu9F5VLv2_T31G, SEQ ID NO:80
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLHSNGITYNY	189	hu9F5VLv2_L33N, SEQ ID NO:73
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLHSNGITYTY	190	hu9F5VLv2_L33T, SEQ ID NO:75
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLHSNGITYSY	191	hu9F5VLv2_L33S, SEQ ID NO:76
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLHSNGITYRY	192	hu9F5VLv2_L33R, SEQ ID NO:77
CDR-L1 Kabat	по	RSSKSLLHSNGITYGY	193	hu9F5VLv2_L33G, SEQ ID NO:82
CDR-L2 Kabat	по	QESNLAS	194	hu9F5VLv2_M51E, SEQ ID NO:61

CDR-L2 Kabat	по	QDSNLAS	195	hu9F5VLv2_M51D, SEQ ID NO:62
CDR-L2 Kabat	по	QGSNLAS	196	hu9F5VLv8_DIM30, SEQ ID NO:161
CDR-L2 Kabat	по	QMSNRAS	197	hu9F5VLv8_DIM29, SEQ ID NO:160
CDR-L2 Kabat	по	QGSNGAS	198	hu9F5VLv8_DIM1, SEQ ID NO:132 и hu9F5VLv9_DIM1, SEQ ID NO:162
CDR-L2 Kabat	по	QGSNTAS	199	hu9F5VLv8_DIM3, SEQ ID NO:134, hu9F5VLv8_DIM14, SEQ ID NO:145, hu9F5VLv8_DIM15, SEQ ID NO:146, hu9F5VLv8_DIM16, SEQ ID NO:147 и hu9F5VLv8_DIM17, SEQ ID NO:148
CDR-L2 Kabat	по	QKSNRAS	200	hu9F5VLv8_DIM7, SEQ ID NO:138, hu9F5VLv8_DIM8, SEQ ID NO:139 и hu9F5VLv9_DIM8, SEQ ID NO:166
CDR-L2 Kabat	по	QKSNGAS	201	hu9F5VLv8_DIM9, SEQ ID NO:140, hu9F5VLv8_DIM10, SEQ ID NO:141 и hu9F5VLv9_DIM10, SEQ ID NO:167
CDR-L2 Kabat	по	QISNRAS	202	hu9F5VLv8_DIM19, SEQ ID NO:150 и hu9F5VLv9_DIM19, SEQ ID NO:170
CDR-L2 Kabat	по	QISNGAS	203	hu9F5VLv8_DIM20, SEQ ID NO:151, hu9F5VLv8_DIM21, SEQ ID NO:152 и hu9F5VLv9_DIM20, SEQ ID NO:171

CDR-L2 Kabat	по	QESNRAS	204	hu9F5VLv8_DIM22, SEQ ID NO:153, hu9F5VLv8_DIM24, SEQ ID NO:155, hu9F5VLv8_DIM25, SEQ ID NO:156 и hu9F5VLv8_DIM26, SEQ ID NO:157
CDR-L2 Kabat	по	QESNGAS	205	hu9F5VLv8_DIM23, SEQ ID NO:154
CDR-L3 Kabat	по	GQNLELPLT	206	hu9F5VLv2_A89G, SEQ ID NO:108
CDR-L3 Kabat	по	AQNDELPLT	207	hu9F5VLv2_L92D, SEQ ID NO:100
CDR-L3 Kabat	по	AQNEELPLT	208	hu9F5VLv2_L92E, SEQ ID NO:102
CDR-L3 Kabat	по	AQNGELPLT	209	hu9F5VLv2_L92G, SEQ ID NO:103, hu9F5VLv8_DIM4, SEQ ID NO:135, hu9F5VLv8_DIM12, SEQ ID NO:143, hu9F5VLv8_DIM15, SEQ ID NO:146, hu9F5VLv8_DIM25, SEQ ID NO:156 и hu9F5VLv9_DIM4, SEQ ID NO:164
CDR-L3 Kabat	по	AQNQELPLT	210	hu9F5VLv2_L92Q, SEQ ID NO:104
CDR-L3 Kabat	по	AQNTELPLT	211	hu9F5VLv2_L92T, SEQ ID NO:107

CDR-L3 Kabat	no	AQNIELPLT	212	hu9F5VLv8_DIM1, SEQ ID NO:132, hu9F5VLv8_DIM2, SEQ ID NO:133, hu9F5VLv8_DIM3, SEQ ID NO:134, hu9F5VLv8_DIM5, SEQ ID NO:136, hu9F5VLv8_DIM6, SEQ ID NO:137, hu9F5VLv8_DIM7, SEQ ID NO:138, hu9F5VLv8_DIM8, SEQ ID NO:139, hu9F5VLv8_DIM9, SEQ ID NO 140, hu9F5VLv8_DIM10, SEQ ID NO:141, hu9F5VLv8_DIM11, SEQ ID NO:142, hu9F5VLv8_DIM14, SEQ ID NO:145, hu9F5VLv8_DIM17, SEQ ID NO:148, hu9F5VLv8_DIM18, SEQ ID NO:149, hu9F5VLv8_DIM19, SEQ ID NO:150, hu9F5VLv8_DIM20, SEQ ID NO:151, hu9F5VLv8_DIM22, SEQ ID NO:153, hu9F5VLv8_DIM23, SEQ ID NO:154, hu9F5VLv8_DIM24, SEQ ID NO:155, hu9F5VLv8_DIM27, SEQ ID NO:158, hu9F5VLv8_DIM28, SEQ ID NO:159, hu9F5VLv8_DIM29, SEQ ID NO:160, hu9F5VLv8_DIM30, SEQ ID NO:161, hu9F5VLv9_DIM1, SEQ ID NO:162, hu9F5VLv9_DIM2, SEQ ID NO:163, hu9F5VLv9_DIM5, SEQ ID NO:165, hu9F5VLv9_DIM8, SEQ ID NO:166, hu9F5VLv9 DIM10,
-----------------	----	-----------	-----	--

CDR-L3 Kabat	по	AQNLGLPLT	213	hu9F5VLv2_L93G, SEQ ID NO:105
CDR-H2 Kabat	по	WIDPENGDTAYASKFQG	220	VH мышиноного 12C4
CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia		AFNIKDDYMN	226	VH мышиноного 17C12
CDR-H2 Kabat	по	WIDPENGDTKYASKFQG	227	VH мышиноного 17C12
CDR-L1 Kabat	по	TSSQSLLSNRKTYLH	229	VL мышиноного 17C12
CDR-L2 Kabat	по	LVSKLES	230	VL мышиноного 17C12
CDR-L3 Kabat	по	LQTTHFPRT	231	VL мышиноного 17C12
CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia		GFSLSTYGMGVG	241	VH мышиноного 14H3
CDR-H2 Kabat	по	NIWWDIKYYNAALKS	242	VH мышиноного 14H3
CDR-H3 Kabat	по	NVDY	243	VH мышиноного 14H3
CDR-L1 Kabat	по	RSSQSLVHSNGNTFLH	245	VL мышиноного 14H3
CDR-L2 Kabat	по	KVSNRFS	246	VL мышиноного 14H3

CDR-L3 Kabat	по	SQSTLVPWT	247	VL мышиноного 14H3
CDR-H2 Contact	по	WIGWIDPENGDTA	258	VH мышиноного 12C4
CDR-H1 Chothia	по	AFNIKDD	259	VH мышиноного 17C12
CDR-H2 по AbM		WIDPENGDTK	260	VH мышиноного 17C12
CDR-H2 Contact	по	WIGWIDPENGDTK	261	VH мышиноного 17C12
CDR-L1 Contact	по	KTYLHWL	262	VL мышиноного 17C12
CDR-L2 Contact	по	LLIYLVSKLE	263	VL мышиноного 17C12
CDR-L3 Contact	по	LQTTHFPR	264	VL мышиноного 17C12
CDR-H1 Kabat	по	TYGMGVG	265	VH мышиноного 14H3
CDR-H1 Chothia	по	GFSLSTYGM	266	VH мышиноного 14H3
CDR-H2 Chothia	по	WWDDI	267	VH мышиноного 14H3
CDR-H2 по AbM		NIWWDDIKY	268	VH мышиноного 14H3
CDR-H1 Contact	по	STYGMGVG	269	VH мышиноного 14H3
CDR-H2 Contact	по	WLANIWWDDIKY	270	VH мышиноного 14H3
CDR-H3 Contact	по	ARNVD	271	VH мышиноного 14H3
CDR-L1 Contact	по	NTFLHWY	272	VL мышиноного 14H3
CDR-L2 Contact	по	LLIYKVSNRF	273	VL мышиноного 14H3
CDR-L3 Contact	по	SQSTLVPW	274	VL мышиноного 14H3
CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia		GFSLSTYGMGVS	275	hu14H3VHv1 и hu14H3VHv2

**Перечень последовательностей**

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTEDGSE  
EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDE  
AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKAGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIPAK  
TPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSP  
SSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD  
NIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHPGGGQVEVKSEK LDFKDRVQSKI  
GSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPV VSGDTSRHL SNVSST  
GSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTEDGSE  
EPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKAG  
ADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPG  
TPGSRSRTPSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTEN  
LKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGS  
LGNHHPGGGQVEVKSEK LDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAK  
AKTDHGAEIVYKSPV VSGDTSRHL SNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-6 (человеческий тау 4RON) (SEQ ID NO:3)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLE  
 DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIP  
 AKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPK  
 SPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDDLNVQSKCGS  
 KDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQ  
 SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSV  
 SSTGSIDMVDSPLATLADEVASLAKQGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQPTEDGSE  
 EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDE  
 AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIPAK  
 TPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSP  
 SSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLG  
 NIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK  
 TDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSVSTGSIDMVDSPLATLADEVASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQPTEDGSE  
 EPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKG  
 ADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPG  
 TPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTEN  
 LKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKI  
 GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSVST  
 GSIDMVDSPLATLADEVASLAKQGL

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLE  
 DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIP  
 AKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPK  
 SPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGS  
 LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK  
 AKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSVSTGSIDMVDSPLATLADEVASLAKQGL

SEQ ID NO:7: Варибельная область тяжелой цепи мышиного антитела 9F5

>m9F5VH

EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMNWVKQRPERGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQ GKATMTADTSSNTAYLQFSSLTSED TAVYYCTTSNGWGQGT LVTVST

SEQ ID NO:8: CDR-H1 мышиного антитела 9F5 согласно композитному определению по Kabat/Chothia

GFNIKDDYMN

SEQ ID NO:9: CDR-H2 мышиного антитела 9F5 по Kabat  
WIDPENGDT EYASKFQG

SEQ ID NO:10: CDR-H3 мышиного антитела 9F5 по Kabat  
SNG

SEQ ID NO:11: Варибельная область легкой цепи мышиного антитела 9F5

>m9F5VL

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWY LQKPGQSPQLLIYQMSNLA  
SGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:12: CDR-L1 мышиного антитела 9F5 по Kabat  
RSSKSLLSNGITYLY

SEQ ID NO:13: CDR-L2 мышиного антитела 9F5 по Kabat  
QMSNLAS

SEQ ID NO:14: CDR-L3 мышиного антитела 9F5 по Kabat  
AQNLELPLT

SEQ ID NO:15: Варибельная область тяжелой цепи hu9F5VHv1  
QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
TEYASKFQ GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCASSNGWGQGT TLTVSS

SEQ ID NO:16: Варибельная область тяжелой цепи hu9F5VHv2  
EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQ GKATMTADTSTNTAYLQLSSLTSED TAVYYCTTSNGWGQGT TTVTVSS

SEQ ID NO:17: Варибельная область тяжелой цепи hu9F5VHv3  
EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQ GRATMTADTSTNTAYLELSSLTSED TAVYYCTTSNGWGQGT TTVTVSS

SEQ ID NO:18: Варибельная область тяжелой цепи hu9F5VHv4  
EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:19: Варибельная область тяжелой цепи hu9F5VHv5  
EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEKGLEWIGWVDPEDGET  
EYASKFQGRATMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:20: Варибельная область тяжелой цепи hu9F5VHv6  
EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQAPEKGLEWMGWVDPEDGE  
TEYASKFQGRATMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:21: Варибельная область тяжелой цепи hu9F5VHv7  
EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVRQAPGKGLEWIGWVDPEDGE  
TEYASKFQGRATMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:22: Варибельная область тяжелой цепи hu9F5VHv8  
EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVRQAPGKGLEWIGWVDPENGDT  
TEYASKFQGRATMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:23: Варибельная область легкой цепи hu9F5VLv1  
DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKLLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLA  
SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPLTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:24: Варибельная область легкой цепи hu9F5VLv2  
DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKLLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:25: Варибельная область легкой цепи hu9F5VLv3  
DIVMTQSPFSNPVTPGESASISCRSSKLLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:26: Варибельная область легкой цепи hu9F5VLv4  
DIVMTQSPFSLPVPGESASISCRSSKLLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:27: Варибельная область легкой цепи hu9F5VLv5  
DIVMTQSPFSLPVPGESASISCRSSKLLHNSGYTYLYWYLQRPQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:28: Варибельная область легкой цепи hu9F5VLv6

DIVMTQSPFSLPVTGEPASISCRSSKSLHNSNGYTYLYWYLQRPQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSGSESGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:29: Вариабельная область легкой цепи hu9F5VLv7

DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLHNSNGINLYWYLQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:30: Структурная модель вариабельной области тяжелой цепи PDB.№  
5OBF-VH\_mSt.

EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTGSGFNIVVYVHWLQKLTQGLEWIGRIDPENGETI  
YTPKFQDKATLTVDTSSNTAYLQLSSLTSEDAAVYYCVSSGYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:31: Акцептор вариабельной области тяжелой цепи, номер доступа в  
GenBank AAN16432-VH\_huFrwk

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDG  
ETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGYRSPMPTANKWGQGTL  
VTVSS

SEQ ID NO:32: Акцептор вариабельной области тяжелой цепи, PDB № 2RCS-  
VH\_huFrwk

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNT  
KYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCASYYGIYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:33: Последовательность вариабельной области тяжелой цепи  
зародышевой линии IМGT № IGHV1-69-2\*01

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDYMHVWVQAPGKGLEWMGLVDPEDG  
ETIYAEKQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT-Q--HWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:34: Структурная модель вариабельной области легкой цепи PDB №  
5OBF-VL\_mSt

DIVMTQSAFNSNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQPPQLLIYQMSNLA  
SGVPDRFTSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:35: Акцептор вариабельной области легкой цепи, номер доступа в  
GenBank CAB51297-VL\_huFrwk

DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS  
GVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO:36: Акцептор вариабельной области легкой цепи, номер доступа в  
GenBank 1911357B-VL\_huFrwk

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKNLLHSNGITFLYWYLQRPQSPQLLIYRVSNLAS  
GVPNRFSGSESGTDFTLRISRVEAEDVGVVYCAQLELPHYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:37: Последовательность варибельной области легкой цепи зародышевой линии, IМGT № IGKV2-28\*01 и IGKJ2\*01

DIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:38 Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельную область тяжелой цепи мышиноного антитела 9F5

ATGAAATGCAGCTGGGTCATCTTCTCCTGATGGCAGTGGTTATAGGGGTCAATTCA  
GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTTGTGAGGCCAGGGCCTCAGTCAA  
GTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTAAACATTAAGACGACTATATGAACTGGGTGAA  
ACAGAGACCTGAACGGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTG  
ATACTGAATATGCCTCGAAGTCCAGGGAAAGGCCACTATGACTGCAGACACATCC  
TCCAACACAGCCTACCTGCAGTTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTAT  
TACTGTACTACAAGTAACGGCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTACA

SEQ ID NO:39 Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельную область легкой цепи мышиноного антитела 9F5

ATGAGGTTCTCTGCTCAGCTTCTGGGGCTGCTTGTGCTCTGGATCCCTGGATCCATTG  
CAGATATTGTGATGACGCAGGCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAAATCAG  
CTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGCATCACTTATT  
GTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATTTATCAGATGTC  
CAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTAGCAGTGGGTCAGGAACTGATT  
CACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTC  
AAAATCTAGAACTTCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO:40: CDR-H1 мышиноного антитела 9F5 по Kabat  
DDYMN

SEQ ID NO:41: CDR-H1 мышиноного антитела 9F5 по Chothia  
GFNIKDD

SEQ ID NO:42: CDR-H2 мышиноного антитела 9F5 по Chothia  
DPENGD

SEQ ID NO:43: CDR-H2 мышиноного антитела 9F5 по AbM  
WIDPENGDTE

SEQ ID NO:44: CDR-H1 мышиногo антитела 9F5 по Contact  
KDDYMN

SEQ ID NO:45: CDR-H2 мышиногo антитела 9F5 по Contact  
WIGWIDPENGDT E

SEQ ID NO:46: CDR-H3 мышиногo антитела 9F5 по Contact  
TTSN

SEQ ID NO:47: CDR-L1 мышиногo антитела 9F5 по Contact  
ITYLYWY

SEQ ID NO:48: CDR-L2 мышиногo антитела 9F5 по Contact  
LLIQMSNLA

SEQ ID NO:49: CDR-L3 мышиногo антитела 9F5 по Contact  
AQNLELPL

SEQ ID NO:50: Альтернативная CDR-H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia гуманизированного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VHv4, hu9F5VHv5 и hu9F5VHv6).  
GFTIKDDYMN

SEQ ID NO:51: Альтернативная CDR-H2 по Kabat гуманизированного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VHv5, hu9F5VHv6 и hu9F5VHv7)  
WVDPEDGETEYASKFQG

SEQ ID NO:52: Альтернативная CDR-H2 по Kabat гуманизированного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VHv8)  
WVDPENGDT EYASKFQG

SEQ ID NO:53: Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизированного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VLv5 и hu9F5VLv6).  
RSSKSLHNSGYTYLY

В SEQ ID NO:54: Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизированного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VLv7)  
RSSKSLHNSGINLY

SEQ ID NO:55: Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизированного антитела 9F5 (присутствует в hu9F5VLv4, hu9F5VLv5, hu9F5VLv6, hu9F5VLv7, SEQ ID NO:133, 135, 136, 137, 142, 143, 144, 149, 158, 159, 163, 164, 165, 168, 169))

QGSNRAS

SEQ ID NO:56: Эпитоп антитела 9F5  
(Q/E)IVYK(S/P)

SEQ ID NO:57: Консенсусный мотив пептида, связываемого антителом 9F5, 10C12,  
2D11 и 17C12  
QIVYKP

SEQ ID NO:58: Консенсусный мотив пептида, связываемого антителом 9F5, 10C12 и  
17C12  
EIVYKSP

SEQ ID NO:59: Линкер  
GSGSGSG

SEQ ID NO:60: Контрольный пептид HA  
YPYDVDPDYAG

SEQ ID NO:61: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также  
известного как hu9F5VLv2\_M51E)  
DIVMTQSPFSPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQESNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:62: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также  
известного как hu9F5VLv2\_M51D)  
DIVMTQSPFSPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQDSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:63: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также  
известного как hu9F5VLv2\_L27cD)  
DIVMTQSPFSPVTPGTSASISCRSSKSLDHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:64: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также  
известного как hu9F5VLv2\_L27cG)  
DIVMTQSPFSPVTPGTSASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:65: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L27cS)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:66: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L27cE)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLEHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:67: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_I30E)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:68: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_I30K)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:69: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L27cT)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLTHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:70: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L27cN)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLNHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:71: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L27bD)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSDLHSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:72: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_I30G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLLSNGGTYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLA  
SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:73: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L33N)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLLSNGITYNYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:74: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L27cA)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLAHSNGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:75: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L33T)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLLSNGITYTYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:76: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L33S)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLLSNGITYSYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:77: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L33R)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLLSNGITYRYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:78: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L30Q)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLLSNGQTYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLA  
SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:79: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L27bT)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSTLHSNGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:80: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_SEQ ID NO:146)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGIGLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:81: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L27bQ)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSQLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:82: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L33G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYGYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:83: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L27cP)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLPHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:84: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_V78R)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRREAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:85: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_I75D)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRDSRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:86: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_V78D)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRDEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:87: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_V78E)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRREEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:88: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_V78P)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRPEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:89: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_V78K)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRKEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:90: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_R77D)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISDVDAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:91: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_V78G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRGEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:92: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_S76P)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRIPRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:93: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_I75P)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRPSRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:94: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_I75Q)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRQSRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:95: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_I75G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRGSRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:96: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L73P)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTPRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:97: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L73G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:98: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_V78Q)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRQEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:99: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_S76G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRIGRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:100: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L92D)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNDELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:101: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_Y86T)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVTYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:102: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L92E)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNEELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:103: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L92G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNGELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:104: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L92Q)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNQELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:105: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L93G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLEGPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:106: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_V85G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGGYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:107: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_L92T)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNTLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:108: Вариант вариабельной области легкой цепи hu9F5VLv2 (также известного как hu9F5VLv2\_A89G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCGQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:109: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_L80P)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYPELSSLRSEDVAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:110: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_L80D)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYDELSSLRSEDVAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:111: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_L82cG)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELSSGRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:112: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_L82cD)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELSSDRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:113: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_L82P)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLEPSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:114: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_L80G)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYGELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:115: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_L82K)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLEKSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:116: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_L82R)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLERSLSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:117: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_L82E)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLEESSLSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:118: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_L82N)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:119: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_Y79D)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTADLELSSLRSEDТАVYYCTTSNGWGQGTТVTVSS

SEQ ID NO:120: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_Y79N)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTANLELSSLRSEDТАVYYCTTSNGWGQGTТVTVSS

SEQ ID NO:121: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_Y79G)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAGLELSSLRSEDТАVYYCTTSNGWGQGTТVTVSS

SEQ ID NO:122: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv5 (также известного hu9F5VHv5\_M80E)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEKGLEWIGWVDPEDGET  
EYASKFQGRATMTADTSTDTAYEELSSLRSEDТАVYYCTTSNGWGQGTЛVTVSS

SEQ ID NO:123: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного hu9F5VHv5\_M80G)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEKGLEWIGWVDPEDGET  
EYASKFQGRATMTADTSTDTAYGELSSLRSEDТАVYYCTTSNGWGQGTЛVTVSS

SEQ ID NO:124: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_L82cS)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELSSSRSEDТАVYYCTTSNGWGQGTТVTVSS

SEQ ID NO:125: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_Y79Q)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAQLELSSLRSEDТАVYYCTTSNGWGQGTТVTVSS

SEQ ID NO:126: Вариант вариабельной области тяжелой цепи hu9F5VHv4 (также известного как hu9F5VHv4\_S82aG)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELGLSRSEDТАVYYCTTSNGWGQGTТVTVSS

SEQ ID NO:127: Варибельная область тяжелой цепи hu9F5VHv9  
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQQRPGKGLEWIGWIDPENGDT  
 TEYASKFQGRATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:128: Варибельная область тяжелой цепи hu9F5VHv10 (также  
 известного как hu9F5VHv9\_Q38K\_G42E)  
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVKQRPEKGLEWIGWIDPENGDT  
 EYASKFQGRATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:129: Варибельная область тяжелой цепи hu9F5VHv10\_L82cG  
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVKQRPEKGLEWIGWIDPENGDT  
 EYASKFQGRATMTADTSTNTAYMELSSGRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:130: Варибельная область легкой цепи hu9F5VLv8  
 DIVMTQSPFSLPVTSGESASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAS  
 GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:131: Варибельная область легкой цепи hu9F5VLv9 (также известного  
 как hu9F5VLv8\_N60D)  
 DIVMTQSPFSLPVTSGESASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAS  
 GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:132: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8  
 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54G, L92I, также известных как  
 hu9F5VLv8\_DIM1).  
 DIQMTQSPFSLPVTSGESASISCRSSKSLSHSHNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQGSNGAS  
 GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:133: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8  
 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, L92I, также известных как  
 hu9F5VLv8\_DIM2).  
 DIQMTQSPFSLPVTSGESASISCRSSKSLSHSHNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
 GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:134: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54T, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM3).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQGSNTAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:135: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, L92G, также известных как hu9F5VLv8\_DIM4).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNGELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:136: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37Q, M51G, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM5).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:137: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cD, L37Q, M51G, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM6).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLDHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:138: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cD, L37Q, M51K, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM7).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLDHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQKSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:139: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37Q, M51K, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM8).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQKSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:140: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37Q, M51K, L54G, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM9)

DIQMTQSPFSLPVTSGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQKSNGAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:141: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37Q, M51K, L54G, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM10)

DIQMTQSPFSLPVTSGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQKSNGAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:142: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM11)

DIQMTQSPFSLPVTSGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:143: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, L92G, также известных как hu9F5VLv8\_DIM12)

DIQMTQSPFSLPVTSGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNGELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:144: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, также известных как hu9F5VLv8\_DIM13)

DIQMTQSPFSLPVTSGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:145: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54T, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM14)

DIQMTQSPFSLPVTGASASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGQKPGQSPQLLIYQGSNTAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:146: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
(hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54T, L92G, также известных как  
hu9F5VLv8\_DIM15).

DIQMTQSPFSLPVTGASASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGQKPGQSPQLLIYQGSNTAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNGELPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:147: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
(hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54T, также известных как hu9F5VLv8\_DIM16).

DIQMTQSPFSLPVTGASASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGQKPGQSPQLLIYQGSNTAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:148: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
(hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37G, M51G, L54T, L92I, также известных как  
hu9F5VLv8\_DIM17).

DIQMTQSPFSLPVTGASASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYGQKPGQSPQLLIYQGSNTAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:149: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
(hu9F5VLv8\_V3Q, L27cD, L37G, M51G, L54R, L92I, также известных как  
hu9F5VLv8\_DIM18)

DIQMTQSPFSLPVTGASASISCRSSKSLDHSNGITYLYWYGQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:150: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
(hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37I, M51I, L54R, L92I, также известных как  
hu9F5VLv8\_DIM19).

DIQMTQSPFSLPVTGASASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYIQKPGQSPQLLIYQISNRASG  
VFNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:151: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
(hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37Q, M51I, L54G, L92I, также известных как  
hu9F5VLv8\_DIM20)

DIQMTQSPFSLPVTGASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQISNGASG  
 VPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:152: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37Q, M51I, L54G, также известных как hu9F5VLv8\_DIM21).  
 DIQMTQSPFSLPVTGASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQISNGASG  
 VPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:153: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37Q, M51E, L54R, L92I, также известных как  
 hu9F5VLv8\_DIM22)  
 DIQMTQSPFSLPVTGASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQESNRAS  
 GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:154: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37Q, M51E, L54G, L92I, также известных как  
 hu9F5VLv8\_DIM23)  
 DIQMTQSPFSLPVTGASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQESNGAS  
 GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:155: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37I, M51E, L54R, L92I, также известных как  
 hu9F5VLv8\_DIM24).  
 DIQMTQSPFSLPVTGASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYIQKPGQSPQLLIYQESNRASG  
 VPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:156: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cG, L37I, M51E, L54R, L92G, также известных как  
 hu9F5VLv8\_DIM25).  
 DIQMTQSPFSLPVTGASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYIQKPGQSPQLLIYQESNRASG  
 VPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNGELPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:157: Вариант переменной области легкой цепи hu9F5VLv8  
 (hu9F5VLv8\_V3Q, L27cI, L37I, M51E, L54R, также известных как hu9F5VLv8\_DIM26)

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLIHSNGITYLYWYIQKPGQSPQLLIYQESNRASG  
VPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:158: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8  
(hu9F5VLv8\_V3Q, L37Q, M51G, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM27)  
DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:159: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8  
(hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, M51G, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM28)  
DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:160: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8  
(hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37Q, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM29)  
DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQKPGQSPQLLIYQMSNRAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:161: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv8  
(hu9F5VLv8\_V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L92I, также известных как hu9F5VLv8\_DIM30)  
DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQKPGQSPQLLIYQGSNLAS  
GVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:162: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv9  
(hu9F5VLv9\_V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54G, L92I, также известных как  
hu9F5VLv9\_DIM1).  
DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQKPGQSPQLLIYQGSNGAS  
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:163: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv9  
(hu9F5VLv9\_V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, L92I, также известных как  
hu9F5VLv9\_DIM2).  
DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:164: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv9 (hu9F5VLv9\_V3Q, L27cS, L37Q, M51G, L54R, L92G, также известных как hu9F5VLv9\_DIM4).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPDRFSSSSSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNGELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:165: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv9 (hu9F5VLv9\_V3Q, L27cG, L37Q, M51G, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv9\_DIM5).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPDRFSSSSSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:166: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv9 (hu9F5VLv9\_V3Q, L27cG, L37Q, M51K, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv9\_DIM8).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQKSNRAS  
GVPDRFSSSSSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:167: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv9 (hu9F5VLv9\_V3Q, L27cS, L37Q, M51K, L54G, L92I, также известных как hu9F5VLv9\_DIM10).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQKSNGAS  
GVPDRFSSSSSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:168: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv9 (hu9F5VLv9\_V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv9\_DIM11).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPDRFSSSSSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:169: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv9 (hu9F5VLv9\_V3Q, L27cG, L37G, M51G, L54R, также известных как hu9F5VLv9\_DIM13).

DIQMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQKPGQSPQLLIYQGSNRAS  
GVPDRFSSSSSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLPLPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:170: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv9 (hu9F5VLv9\_V3Q, L27cS, L37I, M51I, L54R, L92I, также известных как hu9F5VLv9\_DIM19).

DIQMTQSPFSLPVTSGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYIQKPGQSPQLLIYQISNRASG  
VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:171: Вариант варибельной области легкой цепи hu9F5VLv9 (hu9F5VLv9\_V3Q, L27cS, L37Q, M51I, L54G, L92I, также известных как hu9F5VLv9\_DIM20).

DIQMTQSPFSLPVTSGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQKPGQSPQLLIYQISNGASG  
VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:172: Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L27bD) (присутствует в hu9F5VLv2\_L27bD, SEQ ID NO:71)

RSSKSDLHSNGITYLY

SEQ ID NO:173: Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L27bT) (присутствует в hu9F5VLv2\_L27bT, SEQ ID NO:79)

RSSKSTLHSNGITYLY

SEQ ID NO:174: Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L27bQ) (присутствует в hu9F5VLv2\_L27bQ, SEQ ID NO:81)

RSSKSQLHSNGITYLY

SEQ ID NO:175: Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L27cD) (присутствует в hu9F5VLv2\_L27cD, SEQ ID NO:63, в hu9F5VLv8\_DIM6, SEQ ID NO:137, в hu9F5VLv8\_DIM7, SEQ ID NO:138 и в hu9F5VLv8\_DIM18, SEQ ID NO:149)

RSSKSLDHSNGITYLY

SEQ ID NO:176: Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L27cG) (присутствует в hu9F5VLv2\_L27cG, SEQ ID NO:64, в hu9F5VLv8\_DIM5, SEQ ID NO:136, в hu9F5VLv8\_DIM8, SEQ ID NO:139, в hu9F5VLv8\_DIM9, SEQ ID NO:140, в hu9F5VLv8\_DIM11, SEQ ID NO:142, в

hu9F5VLv8\_DIM12, SEQ ID NO:143, в hu9F5VLv8\_DIM13, SEQ ID NO:144, в  
hu9F5VLv8\_DIM14, SEQ ID NO:145, в hu9F5VLv8\_DIM15, SEQ ID NO:146, в  
hu9F5VLv8\_DIM16, SEQ ID NO:147, в hu9F5VLv8\_DIM23, SEQ ID NO:154, в  
hu9F5VLv8\_DIM24, SEQ ID NO:155, в hu9F5VLv8\_DIM25, SEQ ID NO:156, в  
hu9F5VLv9\_DIM5, SEQ ID NO:165, в hu9F5VLv9\_DIM8, SEQ ID NO:166, в  
hu9F5VLv9\_DIM11, SEQ ID NO:168 и в hu9F5VLv9\_DIM13, SEQ ID NO:169)

RSSKSLGHSNGITYLY

SEQ ID NO:177 Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного  
антитела 9F5 (L27cS) (присутствует в hu9F5VLv2\_L27cS, SEQ ID NO:65, в  
hu9F5VLv8\_DIM1, SEQ ID NO:132, в hu9F5VLv8\_DIM2, SEQ ID NO:133, в  
hu9F5VLv8\_DIM3, SEQ ID NO:134, в hu9F5VLv8\_DIM4, SEQ ID NO:135, в  
hu9F5VLv8\_DIM10, SEQ ID NO:141, в hu9F5VLv8\_DIM17, SEQ ID NO:148,  
hu9F5VLv8\_DIM19, SEQ ID NO:150, в hu9F5VLv8\_DIM20, SEQ ID NO:151, в  
hu9F5VLv8\_DIM21, SEQ ID NO:152, в hu9F5VLv8\_DIM22, SEQ ID NO:153, в  
hu9F5VLv8\_DIM28, SEQ ID NO:159, в hu9F5VLv8\_DIM29, SEQ ID NO:160, в  
hu9F5VLv8\_DIM30, SEQ ID NO:161, в hu9F5VLv9\_DIM1, SEQ ID NO:162, в  
hu9F5VLv9\_DIM2, SEQ ID NO:163, в hu9F5VLv9\_DIM4, SEQ ID NO:164, в  
hu9F5VLv9\_DIM10, SEQ ID NO:167, в hu9F5VLv9\_DIM19, SEQ ID NO:170 и в  
hu9F5VLv9\_DIM20, SEQ ID NO:171)

RSSKSLSHSNGITYLY

SEQ ID NO:178 Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного  
антитела 9F5 (L27cE) (присутствует в hu9F5VLv2\_L27cE, SEQ ID NO:66)

RSSKSLEHSNGITYLY

SEQ ID NO:179 Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного  
антитела 9F5 (L27cT) (присутствует в hu9F5VLv2\_L27cT, SEQ ID NO:69)

RSSKSLTHSNGITYLY

SEQ ID NO:180 Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного  
антитела 9F5 (L27cN) (присутствует в hu9F5VLv2\_L27cN, SEQ ID NO:70)

RSSKSLNHSNGITYLY

SEQ ID NO:181      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L27cA) (присутствует в hu9F5VLv2\_L27cA, SEQ ID NO:74)

RSSKSLAHSNGITYLY

SEQ ID NO:182      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L27cP) (присутствует в hu9F5VLv2\_L27cP, SEQ ID NO:83)

RSSKSLPHSNGITYLY

SEQ ID NO:183      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L27cI) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM26, SEQ ID NO:157)

RSSKSLIHSNGITYLY

SEQ ID NO:184      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (I30E) (присутствует в hu9F5VLv2\_I30E, SEQ ID NO:67)

RSSKSLHLSNGETYLY

SEQ ID NO:185      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (I30K) (присутствует в hu9F5VLv2\_I30K, SEQ ID NO:68)

RSSKSLHLSNGKTYLY

SEQ ID NO:186      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (I30G) (присутствует в hu9F5VLv2\_I30G, SEQ ID NO:72)

RSSKSLHLSNGGTYLY

SEQ ID NO:187      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (I30Q) (присутствует в hu9F5VLv2\_I30Q, SEQ ID NO:78)

RSSKSLHLSNGQTYLY

SEQ ID NO:188      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (T31G) (присутствует в hu9F5VLv2\_T31G, SEQ ID NO:80)

RSSKSLHLSNGIGYLY

SEQ ID NO:189      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L33N) (присутствует в hu9F5VLv2\_L33N, SEQ ID NO:73)

RSSKSLHLSNGITYNY

SEQ ID NO:190      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L33T) (присутствует в hu9F5VLv2\_L33T, SEQ ID NO:75)

RSSKSLHLSNGITYTY

SEQ ID NO:191      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L33S) (присутствует в hu9F5VLv2\_L33S, SEQ ID NO:76)

RSSKSLHLSNGITYSY

SEQ ID NO:192      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L33R) (присутствует в hu9F5VLv2\_L33R, SEQ ID NO:77)

RSSKSLHLSNGITYRY

SEQ ID NO:193      Альтернативная CDR-L1 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L33G) (присутствует в hu9F5VLv2\_L33G, SEQ ID NO:82)

RSSKSLHLSNGITYGY

SEQ ID NO:194      Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (M51E) (присутствует в hu9F5VLv2\_M51E, SEQ ID NO:61)

QESNLAS

SEQ ID NO:195      Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (M51D) (присутствует в hu9F5VLv2\_M51D, SEQ ID NO:62)

QDSNLAS

SEQ ID NO:196      Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (M51G) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM30, SEQ ID NO:161)

QGSNLAS

SEQ ID NO:197 Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L54R) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM29, SEQ ID NO:160)

## QMSNRAS

SEQ ID NO:198 Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (M51G L54G) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM1, SEQ ID NO:132 и в hu9F5VLv9\_DIM1, SEQ ID NO:162)

## QGSNGAS

SEQ ID NO:199 Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (M51G L54T) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM3, SEQ ID NO:134, в hu9F5VLv8\_DIM14, SEQ ID NO:145, в hu9F5VLv8\_DIM15, SEQ ID NO:146, в hu9F5VLv8\_DIM16, SEQ ID NO:147 и в hu9F5VLv8\_DIM17, SEQ ID NO:148)

## QGSNTAS

SEQ ID NO:200 Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (M51K L54R) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM7, SEQ ID NO:138, в hu9F5VLv8\_DIM8, SEQ ID NO:139 и в hu9F5VLv9\_DIM8, SEQ ID NO:166)

## QKSNRAS

SEQ ID NO:201 Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (M51K L54G) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM9, SEQ ID NO:140, в hu9F5VLv8\_DIM10, SEQ ID NO:141, и в hu9F5VLv9\_DIM10, SEQ ID NO:167)

## QKSNGAS

SEQ ID NO:202 Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (M51I L54R) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM19, SEQ ID NO:150 и в hu9F5VLv9\_DIM19, SEQ ID NO:170)

## QISNRAS

SEQ ID NO:203 Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (M51I L54G) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM20, SEQ ID NO:151, в hu9F5VLv8\_DIM21, SEQ ID NO:152 и в hu9F5VLv9\_DIM20, SEQ ID NO:171)

## QISNGAS

SEQ ID NO:204 Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (M51E L54R) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM22, SEQ ID NO:153, в hu9F5VLv8\_DIM24, SEQ ID NO:155, в hu9F5VLv8\_DIM25, SEQ ID NO:156 и в hu9F5VLv8\_DIM26, SEQ ID NO:157)

## QESNRAS

SEQ ID NO:205 Альтернативная CDR-L2 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (M51E L54G) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM23, SEQ ID NO:154)

## QESNGAS

SEQ ID NO:206 Альтернативная CDR-L3 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (A89G) (присутствует в hu9F5VLv2\_A89G, SEQ ID NO:108)

## GQNLELPLT

SEQ ID NO:207 Альтернативная CDR-L3 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L92D) (присутствует в hu9F5VLv2\_L92D, SEQ ID NO:100)

## AQNDELPLT

SEQ ID NO:208 Альтернативная CDR-L3 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L92E) (присутствует в hu9F5VLv2\_L92E, SEQ ID NO:102)

## AQNEELPLT

SEQ ID NO:209 Альтернативная CDR-L3 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L92G) (присутствует в hu9F5VLv2\_L92G, SEQ ID NO:103, в hu9F5VLv8\_DIM4, SEQ ID NO:135, в hu9F5VLv8\_DIM12, SEQ ID NO:143, в hu9F5VLv8\_DIM15, SEQ ID NO:146, в hu9F5VLv8\_DIM25, SEQ ID NO:156 и в hu9F5VLv9\_DIM4, SEQ ID NO:164)

## AQNGELPLT

SEQ ID NO:210 Альтернативная CDR-L3 по Kabat гуманизованного антитела 9F5 (L92Q) (присутствует в hu9F5VLv2\_L92Q, SEQ ID NO:104)

## AQNQELPLT

SEQ ID NO:211 Альтернативная CDR-L3 по Kabat гуманизированного антитела 9F5 (L92T) (присутствует в hu9F5VLv2\_L92T, SEQ ID NO:107)

AQNTELPLT

SEQ ID NO:212 Альтернативная CDR-L3 по Kabat гуманизированного антитела 9F5 (L92I) (присутствует в hu9F5VLv8\_DIM1, SEQ ID NO:132, в hu9F5VLv8\_DIM2, SEQ ID NO:133, в hu9F5VLv8\_DIM3, SEQ ID NO:134, в hu9F5VLv8\_DIM5, SEQ ID NO:136, в hu9F5VLv8\_DIM6, SEQ ID NO:137, в hu9F5VLv8\_DIM7, SEQ ID NO:138, в hu9F5VLv8\_DIM8, SEQ ID NO:139, в hu9F5VLv8\_DIM9, SEQ ID NO 140, hu9F5VLv8\_DIM10, SEQ ID NO:141, в hu9F5VLv8\_DIM11, SEQ ID NO:142, в hu9F5VLv8\_DIM14, SEQ ID NO:145, в hu9F5VLv8\_DIM17, SEQ ID NO:148, в hu9F5VLv8\_DIM18, SEQ ID NO:149, в hu9F5VLv8\_DIM19, SEQ ID NO:150, в hu9F5VLv8\_DIM20, SEQ ID NO:151, в hu9F5VLv8\_DIM22, SEQ ID NO:153, в hu9F5VLv8\_DIM23, SEQ ID NO:154, в hu9F5VLv8\_DIM24, SEQ ID NO:155, в hu9F5VLv8\_DIM27, SEQ ID NO:158, в hu9F5VLv8\_DIM28, SEQ ID NO:159, в hu9F5VLv8\_DIM29, SEQ ID NO:160, в hu9F5VLv8\_DIM30, SEQ ID NO:161, в hu9F5VLv9\_DIM1, SEQ ID NO:162, в hu9F5VLv9\_DIM2, SEQ ID NO:163, в hu9F5VLv9\_DIM5, SEQ ID NO:165, в hu9F5VLv9\_DIM8, SEQ ID NO:166, in hu9F5VLv9\_DIM10, SEQ ID NO:167, в hu9F5VLv9\_DIM11, SEQ ID NO:168, в hu9F5VLv9\_DIM19, SEQ ID NO:170 и в hu9F5VLv9\_DIM20, SEQ ID NO:171)

AQNIELPLT

SEQ ID NO:213 Альтернативная CDR-L3 по Kabat гуманизированного антитела 9F5 (L93G) (присутствует в hu9F5VLv2\_L93G, SEQ ID NO:105)

AQNLGLPLT

SEQ ID NO:214 Варибельные области тяжелой цепи тяжелой цепи hu10C12VHv1  
 QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQQAPGKGLEWIGWIDPENGD  
 TEYASKFQGRATMTADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:215 Варибельные области тяжелой цепи тяжелой цепи hu10C12VHv2  
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQQAPGKGLEWIGWIDPENGD  
 TEYASKFQGRATMTADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:216 Варибельная область легкой цепи hu10C12VLv1

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA  
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO:217 Варибельная область легкой цепи hu10C12VLv2

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA  
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:218: Акцептор варибельной области тяжелой цепи, CAC20421-  
VH\_huFrwk

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTFDYYMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDG  
ETIYAEKFQGRVTITADTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCARIPLFGRDHWGQGLVTV  
SS

SEQ ID NO:219 Варибельные области тяжелой цепи мышиноного антитела 12C4

EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMNWVRQRPERGLEWIGWIDPENGDT  
AYASKFQGKATMTADTSSNTAYLQFSSLTSEDSAVYYCTTSNGWGQGLVTVSA

SEQ ID NO:220: CDR-H2 мышиноного антитела 12C4 по Kabat

WIDPENGDTAYASKFQG

SEQ ID NO:221 Варибельные области тяжелой цепи тяжелой цепи hu12C4VHv1

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDDYMNWVQQAPGKGLEWMGWIDPENG  
DTAYASKFQGRVTITADTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCARSNGWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:222 Варибельные области тяжелой цепи тяжелой цепи hu12C4VHv2

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDDYMNWVQQAPGKGLEWIGWIDPENGDT  
TAYASKFQGRVTITADTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:223 Варибельная область легкой цепи hu12C4VLv1

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA  
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO:224 Варибельная область легкой цепи hu12C4VLv2

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA  
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:225 Варибельные области тяжелой цепи мышиноного антитела 17C12

KIQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASAFNIKDDYMNWVKRPERGLEWIGWIDPENGDT  
KYASKFQGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTTSNGWGQGLVTVSA

SEQ ID NO:226 CDR H1 мышиногo антитела 17C12 согласно композитному определению по Kabat-Chothia

AFNIKDDYMN

SEQ ID NO:227 CDR H2 мышиногo антитела 17C12 по Kabat

WIDPENGDTKYASKFQG

SEQ ID NO:228 Вариабельная область легкой цепи мышиногo антитела 17C12

DVVMQTPLTLSVTIGQPASISCTSSQSLLSNRKTYLHWLLQRPQSPKLLIYLVSKLES  
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQTTHFPRTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:229: CDR-L1 мышиногo антитела 17C12 по Kabat

TSSQSLLSNRKTYLH

SEQ ID NO:230: CDR-L2 мышиногo антитела 17C12 по Kabat

LVSKLES

SEQ ID NO:231: CDR-L3 мышиногo антитела 17C12 по Kabat

LQTTHFPRT

SEQ ID NO:232 Вариабельные области тяжелой цепи тяжелой цепи hu17C12VHv1

QIQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASAFNIKDDYMNWVQAPGKLEWIGWIDPENGDT  
KYASKFQGRATMTADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSR

SEQ ID NO:233 Вариабельные области тяжелой цепи тяжелой цепи hu17C12VHv2

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKRPEQGLEWIGWIDPENGDT  
EYASKFQGKATMTADTSTNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:234 Вариабельная область легкой цепи hu17C12VLv1

DVVMQTPLSLSVTPGQPASISCTSSQSLLSNRKTYLHWLLQKPGQPPQLLIYLVSKLE  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQTTHFPRTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:235 Вариабельная область легкой цепи hu17C12VLv2

DVVMQTPLSLSVTPGQPASISCTSSQSLLSNRKTYLHWLLQKPGQSPQLLIYLVSKLE  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQTTHFPRTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:236 Структурная модель вариабельной области тяжелой цепи 3PP3-VH\_mSt

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD  
 TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT  
 LTVSS

SEQ ID NO:237 Структурная модель переменной области легкой цепи 3PP3-  
 VL\_mSt

DIVMTQTPLSLPVTGPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVS  
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:238: Акцептор переменной области легкой цепи, QDO16713-  
 VL\_huFrwk

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLSHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFS  
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:239: Последовательность переменной области легкой цепи  
 зародышевой линии, IGKV2-29\*02 и IGKJ4\*01

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLSHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVSSRFS  
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:240 Переменные области тяжелой цепи мышинного антитела 14H3  
 QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTYGMGVGWIRQPSGKGLEWLANIWWDDIK  
 YYNAALKSRLTISKDTSKNQVFLKIASVDTADTATYYCARNVDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:241 CDR H1 мышинного антитела 14H3 согласно композитному  
 определению по Kabat-Chothia

GFSLSTYGMGVG

SEQ ID NO:242 CDR H2 мышинного антитела 14H3 по Kabat

NIWWDDIKYYNAALKS

SEQ ID NO:243 CDR H3 мышинного антитела 14H3 по Kabat

NVDY

SEQ ID NO:244 Переменная область легкой цепи мышинного антитела m14H3  
 DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSGNTFLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS  
 NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTLVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:245 CDR L1 мышинного антитела 14H3 по Kabat

RSSQSLVHSGNTFLH

SEQ ID NO:246 CDR L2 мышиноного антитела 14H3 по Kabat

KVSNRFS

SEQ ID NO:247 CDR L3 мышиноного антитела 14H3 по Kabat

SQSTLVPWT

SEQ ID NO:248 Вариабельные области тяжелой цепи тяжелой цепи hu14H3VHv1

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVSWIRQPPGKALEWLANIWWDDIK  
YYNAALKSRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATYYCARNVDYWGQGMVTVSL

SEQ ID NO:249 Вариабельные области тяжелой цепи тяжелой цепи hu14H3VHv2

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVSWIRQPPGKALEWLANIWWDDIK  
YYNAALKSRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATYYCARNVDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:250 Вариабельная область легкой цепи hu14H3VLv1

DVVMQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHNSGNTFLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRF  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTLVPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:251 Вариабельная область легкой цепи hu14H3VLv2

DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHNSGNTFLHWYQKPGQSPQLLIYKVS NRF  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTLVPWTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:252 Структурная модель вариабельной области тяжелой цепи 2VQ1-  
VH\_mSt

QITLEESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSSSAMSVMWIRQPSGKGLEWLAHIWWNDDKY  
YNPALKSRLTVSKDSSDNQVFLKIASVVTADTATYYCARIPGFDFYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:253: Акцептор вариабельной области тяжелой цепи, QDJ57937-  
VH\_huFrwk

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMRVSWIRQPPGKALEWLARIDWDDDK  
FYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATYYCARLAVADAFDIWGQGMVTV  
SL

SEQ ID NO:254: Последовательность вариабельной области легкой цепи  
зародышевой линии, IGHV1-70\*04 и IGHJ4\*01

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMRVSWIRQPPGKALEWLARIDWDDDK  
FYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATYYCARNDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:255 Структурная модель переменной области легкой цепи 2VQ1-  
VL\_mSt

DVVMQTPLSLSVSLGDQASISCRSSQSLVHSGNTFLQWYLQKPGQSPKLLIYKVSINRF  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRMEAEADLGIYFCSQTTHVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:256: Акцептор переменной области легкой цепи, ABC66914-  
VL\_huFrwk

DIVMTQTPLSLPVTPEPASICRSSLHSGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEADVGVYYCMQALQPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:257: CDR-H2 мышиного антитела 12C4 по AbM  
WIDPENGDTA

SEQ ID NO:258: CDR-H2 мышиного антитела 12C4 по Contact  
WIGWIDPENGDTA

SEQ ID NO:259: CDR-H1 мышиного антитела 17C12 по Chothia  
AFNIKDD

SEQ ID NO:260: CDR-H2 мышиного антитела 17C12 по AbM  
WIDPENGDTK

SEQ ID NO:261: CDR-H2 мышиного антитела 17C12 по Contact  
WIGWIDPENGDTK

SEQ ID NO:262: CDR-L1 мышиного антитела 17C12 по Contact  
KTYLHWL

SEQ ID NO:263: CDR-L2 мышиного антитела 17C12 по Contact  
LLIYLVSKLE

SEQ ID NO:264: CDR-L3 мышиного антитела 17C12 по Contact  
LQTTHFPR

SEQ ID NO:265: CDR-H1 мышиного антитела 14H3 по Kabat  
TYGMGVG

SEQ ID NO:266: CDR-H1 мышиного антитела 14H3 по Chothia  
GFSLSTYGM

SEQ ID NO:267: CDR-H2 мышиноного антитела 14H3 по Chothia

WWDDI

SEQ ID NO:268: CDR-H2 мышиноного антитела 14H3 по AbM

NIWWDDIKY

SEQ ID NO:269: CDR-H1 мышиноного антитела 14H3 по Contact

STYGMGVG

SEQ ID NO:270: CDR-H2 мышиноного антитела 14H3 по Contact

WLANIWWDDIKY

SEQ ID NO:271: CDR-H3 мышиноного антитела 14H3 по Contact

ARNVD

SEQ ID NO:272: CDR-L1 мышиноного антитела 14H3 по Contact

NTFLHWY

SEQ ID NO:273: CDR-L2 мышиноного антитела 14H3 по Contact

LLIYKVSNRF

SEQ ID NO:274: CDR-L3 мышиноного антитела 14H3 по Contact

SQSTLVPW

SEQ ID NO:275 Альтернативная CDR H1 согласно композитному определению по Kabat-Chothia, как в hu14H3VHv1 и hu14H3VHv2

GFSLSTYGMGVS

SEQ ID NO:276: Консенсусный мотив пептида, связываемого антителом 9F5, 10C12, 2D11, 12C4, 17C12 и 14H3

IVYK

SEQ ID NO:277 Консенсусный мотив пептида, связываемого антителом 2D11

EIVYKS

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с человеческим тау, содержащее три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи мышиноного антитела, характеризующегося вариативной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 7, и вариативной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 11; или

три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи мышиноного антитела, характеризующегося вариативной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 219, и вариативной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 11; или

три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи мышиноного антитела, характеризующегося вариативной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 225, и вариативной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 228.

2. Антитело по п.1, где указанное антитело содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи мышиноного антитела, характеризующегося вариативной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 7, и вариативную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 11.

3. Антитело по п.2, в котором три CDR тяжелой цепи CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 согласно композитному определению по Kabat/Chothia представляют собой, соответственно, SEQ ID NO: 8, 9 и 10, за исключением того, что положение H28 может быть занято N или T, положение H51 может быть занято I или V, положение H54 может быть занято N или D, а положение H56 может быть занято D или E, и три CDR легкой цепи CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 согласно композитному определению по Kabat/Chothia представляют собой, соответственно, SEQ ID NO: 12, 13 и 14, за исключением того, что положение L27b

занято L, D, T или Q, положение L27c занято L, D, G, S, E, T, N, A, P или I, положение L30 может быть занято I, Y, E, K, G или Q, положение L31 может быть занято T, N или G, положение L33 занято L, N, T, S, R или G, положение L51 может быть занято M, G, E, D, K или I, положение L54 может быть занято L, R, G или T, положение L89 занято A или G, положение L92 занято L, D, E, G, Q, T или I, а положение L93 занято E или G.

4. Антитело по п.3, в котором CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 50, в котором CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52, в котором CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность, включающую любую из SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 172-193, в котором CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность, включающую любую из SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 194-205, и в котором CDR-L3 имеет аминокислотную последовательность, включающую любую из SEQ ID NO: 206-213.

5. Антитело по любому из пп.1-4, причем антитело представляет собой гуманизованное антитело, содержащее гуманизованную зрелую вариабельную область тяжелой цепи и гуманизованную зрелую вариабельную область легкой цепи.

6. Антитело по п.5, в котором гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по Kabat, имеющие последовательности SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, а гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по Kabat, имеющие последовательности SEQ ID NO: 12-14.

7. Антитело по любому из пп.1-6, в котором по меньшей мере одно из следующих положений занято указанной аминокислотой: H1 занято Q или E, H5 занято Q или V, H11 занято L или V, H12 занято V или K, H17 занято S или T, H20 занято L или I, H23 занято T или K, H28 занято N или T, H38 занято K, R или Q, H40 занято R или A, H42 занято E или G, H43 занято Q или K, H48 занято I или M, H51 занято I или V, H54 занято N или D, H56 занято D или E, H66 занято K или R, H69 занято I или M, H75 занято S или T, H76 занято N или D, H79 занято Y, Q, D, N или G, H80 занято L, M, P, D, G или E, H81 занято Q или E, H82 занято L, P, K, R, E или N, H82a занято S или G, H82c занято L, G, D или S, H83 занято T или R, H93 занято A или T, H94 занято S или T, H108 занято T или L, H109 занято L или V, L3 представляет собой V или Q, L7 представляет собой A или S, L8 представляет собой A или P, L9 представляет собой F или L, L11 представляет собой N или L, L15 представляет собой L или P, L17 представляет собой T или E, L18 представляет собой S или P, L27b представляет собой L, D, T или Q, L27c представляет собой L, D, G, S, E, T, N, A, P или I, L30 представляет собой I, Y, E, K или G, L31 представляет собой T, N или G, L33 представляет собой L, N, T, S, R или G, L37 представляет собой L, Q, G или I, L39 представляет собой R или K, L51 представляет собой M, G, E, D, K или I, L54 представляет собой R, G или T, L60 представляет собой N или D, L64 представляет собой G или S, L66 представляет собой E или G, L73 представляет собой L, P или G, L74 представляет собой R или K, L75 представляет собой I, D, P, Q или G, L76 представляет собой S, P или G, L77 представляет собой R или D, L78 представляет собой V, R, D, E, P, K, G или Q, L85 представляет собой V или G, L86 представляет собой Y или T, L89 представляет собой A или G, L92 представляет собой L, D, E, G, Q, T или I, L93 представляет собой E или G, L100 представляет собой G или Q.

8. Антитело по п.7 в котором вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127 или SEQ ID NO: 128.

9. Антитело по любому из пп.1-6, в котором зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 15-22 и SEQ ID NO: 109-129, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23-29, SEQ ID NO: 61-108 и SEQ ID NO: 130-171.

10. Антитело по п.9, в котором зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149; или

зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, или

зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159, или

зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148, или

зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, или

зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

145, или

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, или

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, или

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, или

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, или

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, или

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, или

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160, или

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161, или

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139, или

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168.

11. Антитело по п.2, содержащее гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи по Kabat, имеющие последовательности SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи по Kabat, имеющие последовательности SEQ ID NO: 12-14.

12. Антитело по п.11, в котором по меньшей мере одно из следующих положений занято указанной аминокислотой: Н1 занято Q или E, Н24 занято A, Н48 занято I, Н67 занято A, Н69 занято M, Н93 занято T, Н94 занято T, L64 представляет собой S, L104 представляет собой V или L.

13. Антитело по п.11, в котором гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 или 215, а гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216 или 217.

14. Антитело по п.1, содержащее три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи мышинового антитела, характеризующегося переменной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 219, и переменной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 11.

15. Антитело по п.14, причем антитело представляет собой гуманизованное антитело.

16. Антитело по п.15, содержащее гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи по Kabat, имеющие последовательности SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 220 и SEQ ID NO: 10, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи по Kabat, имеющие последовательности SEQ ID NO: 12-14.

17. Антитело по любому из пп.14-16, в котором по меньшей мере одно из следующих положений занято указанной аминокислотой: Н1 занято Q или E, Н48 занято M или I, Н93 занято A или T, Н94 занято R или T, L64 представляет собой G или S, L104 представляет собой V или L.

18. Антитело по любому из пп.14-16, в котором зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 221 или 222, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223 или 224.

19. Антитело по п.1, содержащее три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи мышинового антитела, характеризующегося переменной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 225, и переменной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 228.

20. Антитело по п.19, причем антитело представляет собой гуманизованное антитело.

21. Антитело по п.20, содержащее гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи,

содержащую три CDR тяжелой цепи по Kabat, имеющие последовательности SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 227 и SEQ ID NO: 10, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи по Kabat, имеющие последовательности SEQ ID NO: 229-231.

22. Антитело по любому из пп.19-21, в котором по меньшей мере одно из следующих положений занято указанной аминокислотой: Н1 занято Q или E, Н2 занято I, Н24 занято A, Н48 занято I, Н67 занято A, Н69 занято M, Н93 занято T, Н94 занято T, Н108 занято T или L, Н113 занято R или S, L2 представляет собой V, L36 представляет собой L, L43 представляет собой P или S.

23. Антитело по любому из пп.19-21, в котором зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232 или 233, а зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234 или 235.

24. Антитело по любому из пп.1-23, причем антитело представляет собой интактное антитело.

25. Антитело по любому из пп.1-23, причем антитело представляет собой связывающий фрагмент.

26. Антитело по любому из пп.1-25, причем изотип представляет собой человеческий IgG1, человеческий IgG2 или человеческий IgG4.

27. Антитело по любому из пп.5-10, 11-13, 15-18, 20-23 и 24-26, в котором зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, а зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи.

28. Антитело по п.27, в котором константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму константной области тяжелой цепи природного человеческого антитела, которая имеет пониженное связывание с рецептором Fcγ по сравнению с константной областью тяжелой цепи природного человеческого антитела.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, как определено по любому из пп.1-28, и фармацевтически приемлемый носитель.

30. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь антитела, описанного в любом из пп.1-28.

31. Нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь антитела, описанного в любом из пп.1-28.

32. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и легкую цепь антитела, описанного в любом из пп.1-28.

33. Способ гуманизации мышинового антитела, включающий:

(a) отбор одной или более последовательностей акцепторных антител;

(b) выявление аминокислотных остатков мышинового антитела, которые должны быть сохранены;

(c) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную тяжелую цепь, включающую CDR тяжелой цепи мышинового антитела, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную легкую цепь, включающую CDR легкой цепи мышинового антитела; и

(d) экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизованного антитела;

где мышинное антитело характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 11, или

мышинное антитело характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 219 и зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 11, или

мышинное антитело характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 225 и зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 228.

34. Способ ингибирования или снижения агрегации тау у субъекта, имеющего или подверженного риску развития тау-опосредованного амилоидоза, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-28, тем самым ингибируя или снижая агрегацию тау у субъекта.

35. Способ лечения или профилактики тау-ассоциированного заболевания у субъекта, включающий введение антитела по любому из пп.1-28, тем самым обеспечивая лечение или профилактику заболевания.

36. Способ по п.35, в котором тау-ассоциированное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичную возрастную тауопатию, постэнцефалитный паркинсонизм, посттравматическую деменцию или деменцию боксеров, болезнь Пика, болезнь Нимана-Пика типа C, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен, глобулярную глиальную тауопатию, боковой амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, кортикобазальную дегенерацию (КБД), деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD - англ.: Lewy body variant of Alzheimer disease), хроническую травматическую энцефалопатию (ХТЭ), глобулярную глиальную тауопатию (ГГТ), болезнь Паркинсона или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

	10	20	30	40	
VH мышиного 9F5	E V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V K L S C T A S G F N I K D D Y M N W V K Q R				40
IGHV1-69-2*01	E V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K V S G Y I F T D Y Y M H W V Q Q A				40
AAN16432_H	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G Y I L T E L S M H W V R Q A				40
2RCS_H	Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y M H W V K Q R				40
hu9F5VHv1	Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C T A S G F N I K D D Y M N W V K Q R				40
hu9F5VHv2	E V Q L Q Q S G A E L V K P G A T V K I S C T A S G F N I K D D Y M N W V K Q R				40
hu9F5VHv3	E V Q L Q Q S G A E L V K P G A T V K I S C T A S G F N I K D D Y M N W V K Q R				40
hu9F5VHv4	E V Q L Q Q S G A E L V K P G A T V K I S C K A S G F T I K D D Y M N W V K Q R				40
hu9F5VHv5	E V Q L Q Q S G A E L V K P G A T V K I S C K A S G F T I K D D Y M N W V K Q R				40
hu9F5VHv6	E V Q L Q Q S G A E L V K P G A T V K I S C K A S G F T I K D D Y M N W V Q Q A				40
hu9F5VHv7	E V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K A S G F N I K D D Y M N W V R Q A				40
hu9F5VHv8	E V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K A S G F N I K D D Y M N W V R Q A				40

	50	60	70	80	
VH мышиного 9F5	P E R G L E W I G W I D P E N G D T E Y A S K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y				80
IGHV1-69-2*01	P G K G L E W M G L V D P E D G E T I Y A E K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y				80
AAN16432_H	P G K G L E W M G G F D P E D G E T I Y A Q K F Q G R V T M T E D T S T D T A Y				80
2RCS_H	P E Q G L E W I G R I D P A N G N T K Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y				80
hu9F5VHv1	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A S K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y				80
hu9F5VHv2	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A S K F Q G K A T M T A D T S T N T A Y				80
hu9F5VHv3	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A S K F Q G K A T M T A D T S T N T A Y				80
hu9F5VHv4	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A S K F Q G K A T M T A D T S T N T A Y				80
hu9F5VHv5	P E K G L E W I G W V D P E D G E T E Y A S K F Q G R A T M T A D T S T D T A Y				80
hu9F5VHv6	P E K G L E W M G V D P E D G E T E Y A S K F Q G R A T M T A D T S T D T A Y				80
hu9F5VHv7	P G K G L E W I G W V D P E D G E T E Y A S K F Q G R A T M T A D T S T D T A Y				80
hu9F5VHv8	P G K G L E W I G W V D P E N G D T E Y A S K F Q G R A T M T A D T S T D T A Y				80

Фиг. 1А

	90	100	110	120	
VH мышиного 9F5	L Q F S S L T S E D T A V Y Y C T - - - - - I S N G - - W G Q G T L V T V S				111
IGHV1-69-2*01	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A - - - - - T Q H - - W G Q G T L V T V S				110
AAN16432_H	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A G Y R S P M P T A N K - - W G Q G T L V T V S				118
2RCS_H	L Q L S S L T S E D T A V Y Y C A - - - - - S Y G I Y W G Q G T L L V S				113
hu9F5VHv1	L Q L S S L T S E D T A V Y Y C T - - - - - T S N G - - W G Q G T L L V S				111
hu9F5VHv2	L Q L S S L T S E D T A V Y Y C T - - - - - T S N G - - W G Q G T T V T V S				111
hu9F5VHv3	L E L S S L R S E D T A V Y Y C T - - - - - T S N G - - W G Q G T T V T V S				111
hu9F5VHv4	L E L S S L R S E D T A V Y Y C T - - - - - T S N G - - W G Q G T T V T V S				111
hu9F5VHv5	M E L S S L R S E D T A V Y Y C T - - - - - T S N G - - W G Q G T L V T V S				111
hu9F5VHv6	M E L S L R S E D T A V Y Y C T - - - - - T S N G - - W G Q G T L V T V S				111
hu9F5VHv7	M E L S S L R S E D T A V Y Y C T - - - - - T S N G - - W G Q G T L V T V S				111
hu9F5VHv8	M E L S S L R S E D T A V Y Y C T - - - - - T S N G - - W G Q G T L V T V S				111

VH мышиного 9F5	T				112
IGHV1-69-2*01	S				111
AAN16432_H	S				119
2RCS_H	S				114
hu9F5VHv1	S				112
hu9F5VHv2	S				112
hu9F5VHv3	S				112
hu9F5VHv4	S				112
hu9F5VHv5	S				112
hu9F5VHv6	S				112
hu9F5VHv7	S				112
hu9F5VHv8	S				112

Фиг. 1В

	10	20	30	40	
VL мышиного 9F5	D I V M T Q A A F S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W				40
IGKV2-28*01_IGKJ2*01	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L H S N G Y N Y L D W				40
CAB51297_L	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L H S N G Y N Y L D W				40
1911357B_L	D I V M T Q A A F S N P V T L G T S A S I S C R S S K N L L H S N G I T F L Y W				40
hu9F5VLv1	D I V M T Q A A F S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W				40
hu9F5VLv2	D I V M T Q S P F S N P V T P G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W				40
hu9F5VLv3	D I V M T Q S P F S N P V T P G E S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W				40
hu9F5VLv4	D I V M T Q S P F S L P V T P G E S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W				40
hu9F5VLv5	D I V M T Q S P F S L P V T P G E S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W				40
hu9F5VLv6	D I V M T Q S P F S L P V T P G E S A S I S C R S S K S L L H S N G Y T Y L Y W				40
hu9F5VLv7	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S K S L L H S N G I N Y L Y W				40

	50	60	70	80	
VL мышиного 9F5	Y L Q X P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P D R F S S S G S G T D F T L R I				80
IGKV2-28*01_IGKJ2*01	Y L Q X P G Q S P Q L L I Y L G S N R A S G V P D R F S S G S G S G T D F T L K I				80
CAB51297_L	Y L Q X P G Q S P Q L L I Y L G S N R A S G V P D R F S S G S G S G T D F T L K I				80
1911357B_L	Y L Q R P G Q S P Q L L I Y R V S N L A S G V P N R F S S G S E S G T D F T L R I				80
hu9F5VLv1	Y L Q R P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P N R F S S S G S G T D F T L R I				80
hu9F5VLv2	Y L Q R P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P N R F S S S G S G T D F T L R I				80
hu9F5VLv3	Y L Q R P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P N R F S S G S G S G T D F T L R I				80
hu9F5VLv4	Y L Q R P G Q S P Q L L I Y Q G S N R A S G V P N R F S S G S G S G T D F T L R I				80
hu9F5VLv5	Y L Q R P G Q S P Q L L I Y Q G S N R A S G V P N R F S S G S G S G T D F T L R I				80
hu9F5VLv6	Y L Q R P G Q S P Q L L I Y Q G S N R A S G V P N R F S S G S G S G T D F T L R I				80
hu9F5VLv7	Y L Q X P G Q S P Q L L I Y Q G S N R A S G V P D R F S S G S G S G T D F T L K I				80

Фиг. 2А

	90	100	110	
VL мышиного 9F5	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G A G T K L E L K			112
IGKV2-28*01_IGKJ2*01	S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L O T P Y T F G G Q T K L E I K			112
CAB51297_L	S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L O T P L T F G G G T K V E I K			112
1911357B_L	S R V E A E D V G V Y Y C A Q L L E L P Y T F G G G T K L E I K			112
hu9F5VLv1	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G G G T K L E I K			112
hu9F5VLv2	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G G G T K L E I K			112
hu9F5VLv3	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G G Q T K L E I K			112
hu9F5VLv4	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G G Q T K L E I K			112
hu9F5VLv5	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G G Q T K L E I K			112
hu9F5VLv6	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G G Q T K L E I K			112
hu9F5VLv7	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G G Q T K L E I K			112

Фиг. 2В





	50	60	70	80	
hu9F5VLv8	Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P N R F S S S G S G T D F T L K I				80
hu9F5VLv8_DIM1	Q . . . . . G . G . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM2	Q . . . . . G . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM3	Q . . . . . G . T . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM4	Q . . . . . G . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM5	Q . . . . . G . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM6	Q . . . . . G . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM7	Q . . . . . K . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM8	Q . . . . . K . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM9	Q . . . . . K . G . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM10	Q . . . . . K . G . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM11	G . . . . . G . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM12	G . . . . . G . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM13	G . . . . . I . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM14	C . . . . . G . T . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM15	G . . . . . G . T . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM16	G . . . . . G . T . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM17	G . . . . . G . T . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM18	G . . . . . G . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM19	I . . . . . I . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM20	Q . . . . . I . G . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM21	Q . . . . . I . G . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM22	Q . . . . . E . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM23	Q . . . . . E . G . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM24	I . . . . . E . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM25	I . . . . . E . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM26	I . . . . . E . R . . . . .				80
hu9F5VLv9_DIM1	Q . . . . . G . G . . . . . D .				80
hu9F5VLv9_DIM2	Q . . . . . G . R . . . . . D .				80
hu9F5VLv9_DIM4	Q . . . . . G . R . . . . . D .				80
hu9F5VLv9_DIM5	Q . . . . . G . R . . . . . D .				80
hu9F5VLv9_DIM8	Q . . . . . K . R . . . . . D .				80
hu9F5VLv9_DIM10	Q . . . . . K . G . . . . . D .				80
hu9F5VLv9_DIM11	G . . . . . G . R . . . . . D .				80
hu9F5VLv9_DIM13	G . . . . . G . R . . . . . D .				80
hu9F5VLv9_DIM19	I . . . . . I . R . . . . . D .				80
hu9F5VLv9_DIM20	Q . . . . . I . G . . . . . D .				80
hu9F5VLv8_DIM27	Q . . . . . G . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM28	Q . . . . . G . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM29	Q . . . . . G . R . . . . .				80
hu9F5VLv8_DIM30	Q . . . . . G . . . . .				80

Фиг. 6B

	90	100	110	
hu9F5VLv8	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G Q G T K L E I K			112
hu9F5VLv8_DIM1	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM2	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM3	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM4	. . . . . G . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM5	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM6	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM7	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM8	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM9	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM10	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM11	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM12	. . . . . G . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM13	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM14	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM15	. . . . . G . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM16	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM17	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM18	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM19	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM20	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM21	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM22	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM23	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM24	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM25	. . . . . G . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM26	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv9_DIM1	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv9_DIM2	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv9_DIM4	. . . . . G . . . . .			112
hu9F5VLv9_DIM5	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv9_DIM8	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv9_DIM10	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv9_DIM11	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv9_DIM13	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv9_DIM19	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv9_DIM20	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM27	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM28	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM29	. . . . . I . . . . .			112
hu9F5VLv8_DIM30	. . . . . I . . . . .			112

Фиг. 6C

	10	20	30	40	
m10C12 VH	E V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V K L S C T A S G F N I K D D Y M N W V K Q R				40
IGHV1-69-2*01	. . . . . V . . . . . V K K . . . . . T . . . . . I . . . . . K V . . . . . Y T F T . . . . . Y . . . . . H . . . . . Q . . . . . A				40
CAC20421 VH	Q . . . . . V . . . . . V K K . . . . . T . . . . . I . . . . . K V . . . . . Y T F T . . . . . Y . . . . . H . . . . . Q . . . . . A				40
hu10C12VHv1	Q . . . . . V . . . . . V K K . . . . . T . . . . . I . . . . . K . . . . . Y T F T . . . . . Y . . . . . H . . . . . Q . . . . . A				40
hu10C12VHv2	. . . . . V . . . . . V K K . . . . . T . . . . . I . . . . . K . . . . . Y T F T . . . . . Y . . . . . H . . . . . Q . . . . . A				40

	50	60	70	80	
m10C12 VH	P E R G L E W I G W I D P E N G D T E Y A S K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y				80
IGHV1-69-2*01	. G K . . . . . M . L V . . . . . D . E . I . . . . . E . . . . . R V . I . . . . . T D . . . . .				80
CAC20421 VH	. G K . . . . . M . L V . . . . . D . E . I . . . . . E . . . . . R V . I . . . . . T D . . . . .				80
hu10C12VHv1	. G K . . . . . M . L V . . . . . D . E . I . . . . . E . . . . . R V . I . . . . . T D . . . . .				80
hu10C12VHv2	. G K . . . . . M . L V . . . . . D . E . I . . . . . E . . . . . R V . I . . . . . T D . . . . .				80

	90	100	110	
m10C12 VH	L Q F S S L T S E D T A V Y Y C T T - - - - S N G W G Q G T L V T V S T			112
IGHV1-69-2*01	M E L . . . . . R . . . . . A - - - - - T Q H . . . . . S			111
CAC20421 VH	M E L . . . . . R . . . . . A R I P L F G R D H . . . . . S			117
hu10C12VHv1	M E L . . . . . R . . . . . A - - - - - T Q H . . . . . S			112
hu10C12VHv2	M E L . . . . . R . . . . . A - - - - - T Q H . . . . . S			112

Фиг. 7

	10	20	30	40	
m10C12 VL	D I V M T Q A A F S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W				40
IGKV2-28*01&IGKJ2*01	. . . . . S P L . L . . . . P . E P . . . . . Q . . . . . Y N . . . D .				40
CAB51297 VL	. . . . . S P L . L . . . . P . E P . . . . . Q . . . . . Y N . . . D .				40
hu10C12VLv1	. . . . . S P L . L . . . . P . E P . . . . . Q . . . . . Y N . . . D .				40
hu10C12VLv2	. . . . . S P L . L . . . . P . E P . . . . . Q . . . . . Y N . . . D .				40
-----					
	50	60	70	80	
m10C12 VL	Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P D R F S S S G S G T D F T L R I				80
IGKV2-28*01&IGKJ2*01	. . . . . L G . . R . . . . . G . . . . . K . . . . .				80
CAB51297 VL	. . . . . L G . . R . . . . . G . . . . . K . . . . .				80
hu10C12VLv1	. . . . . L G . . R . . . . . G . . . . . K . . . . .				80
hu10C12VLv2	. . . . . L G . . R . . . . . G . . . . . K . . . . .				80
-----					
	90	100	110		
m10C12 VL	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G A G T K L E L K				112
IGKV2-28*01&IGKJ2*01	. . . . . M . A . Q T . Y . . . . Q . . . . I . . . .				112
CAB51297 VL	. . . . . M . A . Q T . . . . . G . . . . V . I . . . .				112
hu10C12VLv1	. . . . . M . A . Q T . . . . . G . . . . V . I . . . .				112
hu10C12VLv2	. . . . . M . A . Q T . . . . . G . . . . V . I . . . .				112

Фиг. 8

	10	20	30	40	
m12C4VH	E V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V K L S C T A S G F N I K D D Y M N W V R Q R				40
IGHV1-69-2*01	. . . . . V . . . . . V K K . . . . T . . I . . K V . . Y T F T . Y . . H . . Q . A				40
CAC20421 VH	. . . . . V . . . . . V K K . . . . T . . I . . K V . . Y T F T . Y . . H . . Q . A				40
hu12C4VHv1	. . . . . V . . . . . V K K . . . . T . . I . . K V . . Y T F T . Y . . H . . Q . A				40
hu12C4VHv2	. . . . . V . . . . . V K K . . . . T . . I . . K V . . Y T F T . Y . . H . . Q . A				40
-----					
	50	60	70	80	
m12C4VH	P E R G L E W I G W I D P E N G D T A Y A S K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y				80
IGHV1-69-2*01	. G K . . . . M . L V . . . . D . E . I . . E . . . . R V . I . . . . T D . . .				80
CAC20421 VH	. G K . . . . M . L V . . . . D . E . I . . E . . . . R V . I . . . . T D . . .				80
hu12C4VHv1	. G K . . . . M . L V . . . . D . E . I . . E . . . . R V . I . . . . T D . . .				80
hu12C4VHv2	. G K . . . . M . L V . . . . D . E . I . . E . . . . R V . I . . . . T D . . .				80
-----					
	90	100	110		
m12C4VH	L Q F S S L T S E D S A V Y Y C T T - - - - S N G W G Q G T L V T V S A				112
IGHV1-69-2*01	M E L . . . . R . . . . T . . . . A . . . . - - - - T Q H . . . . . S . . . .				111
CAC20421 VH	M E L . . . . R . . . . T . . . . A R I P L F G R D H . . . . . S . . . .				117
hu12C4VHv1	M E L . . . . R . . . . T . . . . A R . . . . - - - - . . . . . S . . . .				112
hu12C4VHv2	M E L . . . . R . . . . T . . . . A R . . . . - - - - . . . . . S . . . .				112

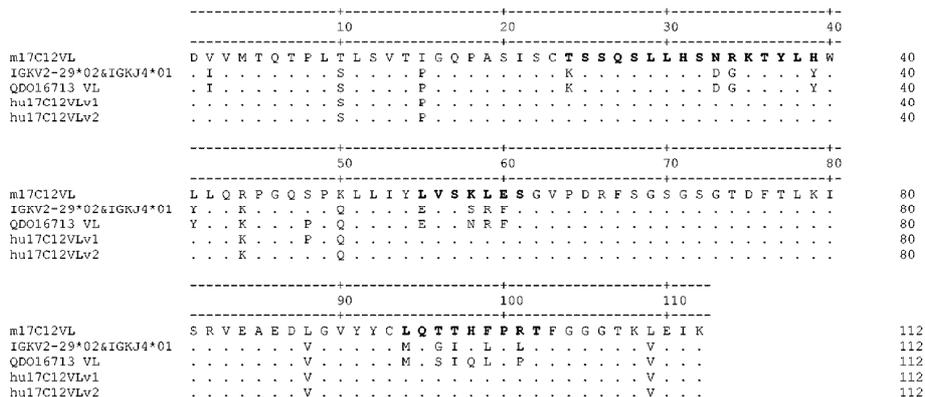
Фиг. 9

	10	20	30	40	
m12C4VL	D I V M T Q A A F S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W				40
IGKV2-28*01&IGKJ2*01	. . . . . S P L . L . . . . P . E P . . . . . Q . . . . . Y N . . . D .				40
CAB51297 VL	. . . . . S P L . L . . . . P . E P . . . . . Q . . . . . Y N . . . D .				40
hu12C4VLv1	. . . . . S P L . L . . . . P . E P . . . . . Q . . . . . Y N . . . D .				40
hu12C4VLv2	. . . . . S P L . L . . . . P . E P . . . . . Q . . . . . Y N . . . D .				40
-----					
	50	60	70	80	
m12C4VL	Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P D R F S S S G S G T D F T L R I				80
IGKV2-28*01&IGKJ2*01	. . . . . L G . . R . . . . . G . . . . . K . . . . .				80
CAB51297 VL	. . . . . L G . . R . . . . . G . . . . . K . . . . .				80
hu12C4VLv1	. . . . . L G . . R . . . . . G . . . . . K . . . . .				80
hu12C4VLv2	. . . . . L G . . R . . . . . G . . . . . K . . . . .				80
-----					
	90	100	110		
m12C4VL	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G A G T K L E L K				112
IGKV2-28*01&IGKJ2*01	. . . . . M . A . Q T . Y . . . . Q . . . . I . . . .				112
CAB51297 VL	. . . . . M . A . Q T . . . . . G . . . . V . I . . . .				112
hu12C4VLv1	. . . . . M . A . Q T . . . . . G . . . . V . I . . . .				112
hu12C4VLv2	. . . . . M . A . Q T . . . . . G . . . . V . I . . . .				112

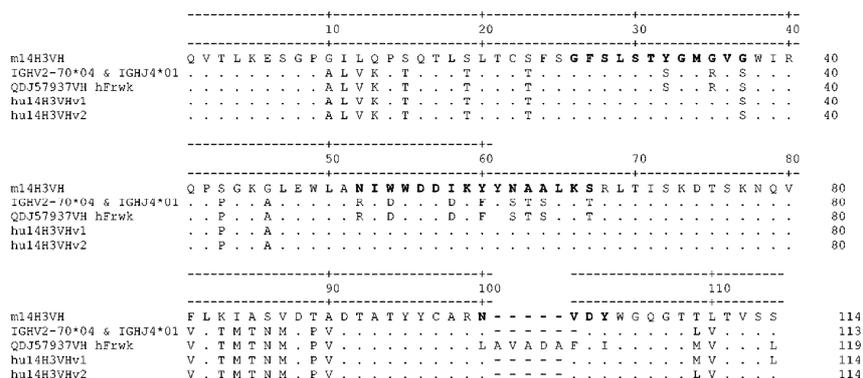
Фиг. 10

	10	20	30	40	
m17C12VH	K I Q L Q Q S G A E L V R P G A S V K L S C T A S A F N I K D D Y M N W V K Q R				40
IGHV1-69-2*01	E V . . . . . V . . . . . V K K . . . . T . . I . . K V . . G Y T F T . Y . . H . . Q . A				40
CAC20421 VH	Q V . . . . . V . . . . . V K K . . . . T . . I . . K V . . G Y T F T . Y . . H . . Q . A				40
hu17C12VHv1	Q . . . . . V . . . . . V K K . . . . T . . I . . K . . . . . Y . . . . . Q . A				40
hu17C12VHv2	E . . . . . V . . . . . V K K . . . . T . . I . . K . . . . . Y . . . . . Q . A				40
-----					
	50	60	70	80	
m17C12VH	P E R G L E W I G W I D P E N G D T K Y A S K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y				80
IGHV1-69-2*01	. G K . . . . M . L V . . . . D . E . I . . E . . . . R V . I . . . . T D . . .				80
CAC20421 VH	. G K . . . . M . L V . . . . D . E . I . . E . . . . R V . I . . . . T D . . .				80
hu17C12VHv1	. G K . . . . M . L V . . . . D . E . I . . E . . . . R . . . . . T D . . .				80
hu17C12VHv2	. G K . . . . M . L V . . . . D . E . I . . E . . . . R . . . . . T D . . .				80
-----					
	90	100	110		
m17C12VH	L Q L S S L T S E D T A V Y Y C T T - - - - S N G W G Q G T L V T V S A				112
IGHV1-69-2*01	M E . . . . R . . . . . A . . . . - - - - T Q H . . . . . S . . . .				111
CAC20421 VH	M E . . . . R . . . . . A R I P L F G R D H . . . . . R . . . .				117
hu17C12VHv1	M E . . . . R . . . . . A . . . . - - - - . . . . . T . . . . R				112
hu17C12VHv2	M E . . . . R . . . . . A . . . . - - - - . . . . . S . . . .				112

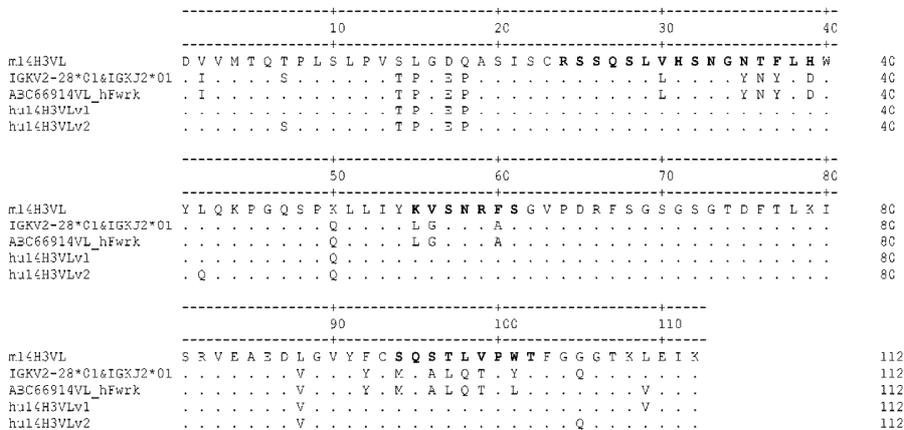
Фиг. 11



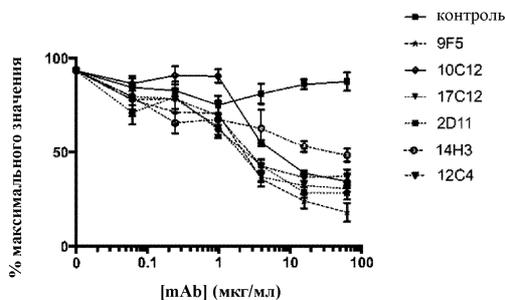
Фиг. 12



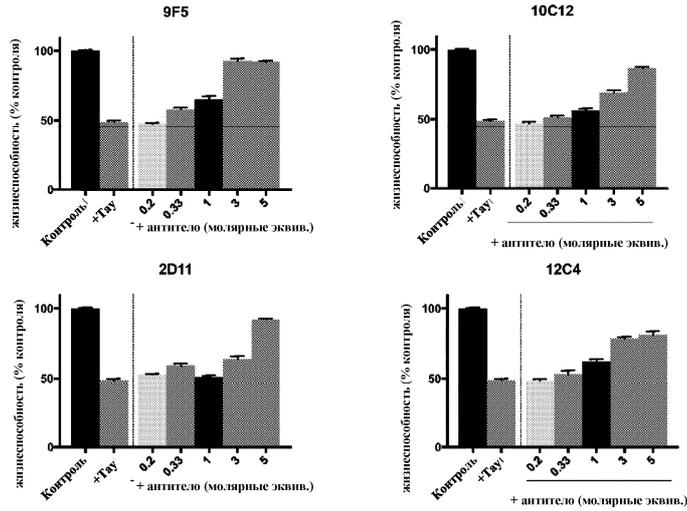
Фиг. 13



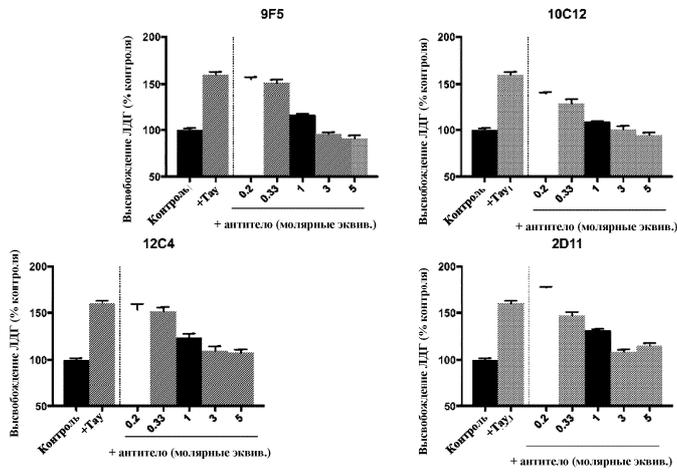
Фиг. 14



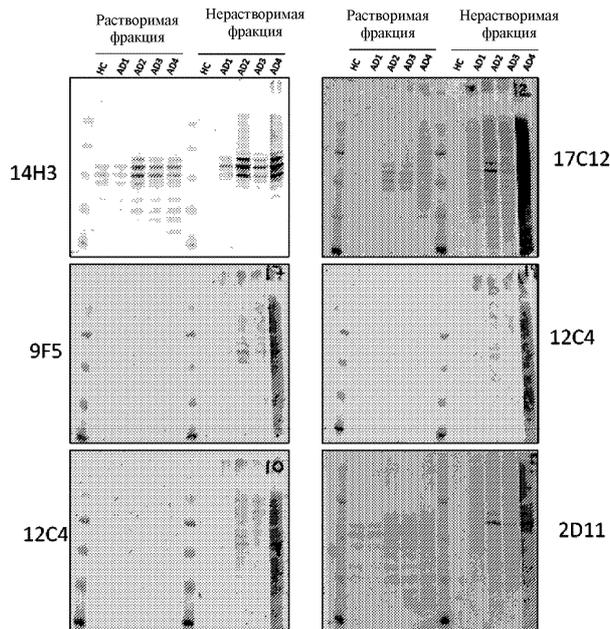
Фиг. 15



Фиг. 16

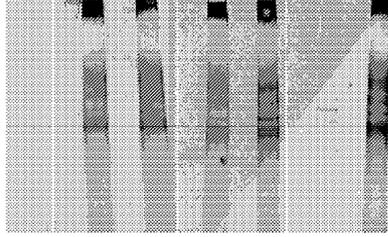


Фиг. 17



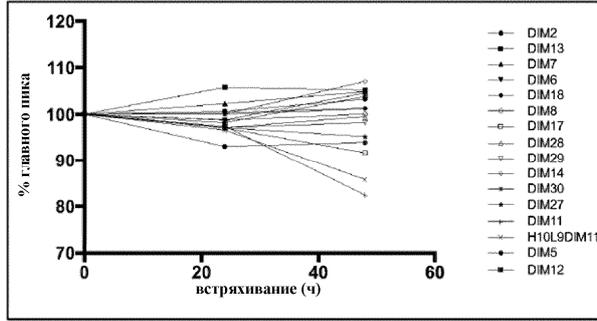
Фиг. 18

Антитело для ИП (иммунопреципитации): контроль 2D11 10C12 9F5 12C4 14H3 17C12

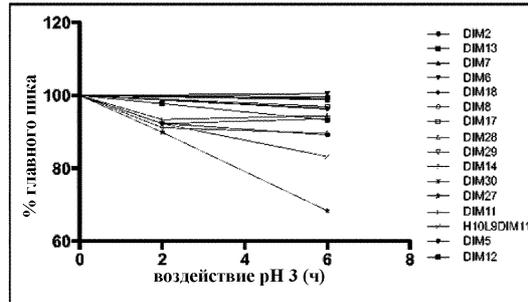


Блот: К9JA

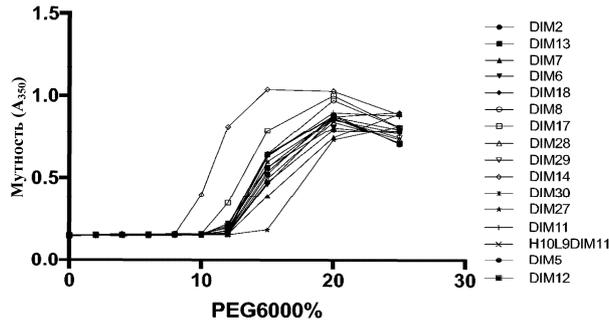
Фиг. 19



Фиг. 20

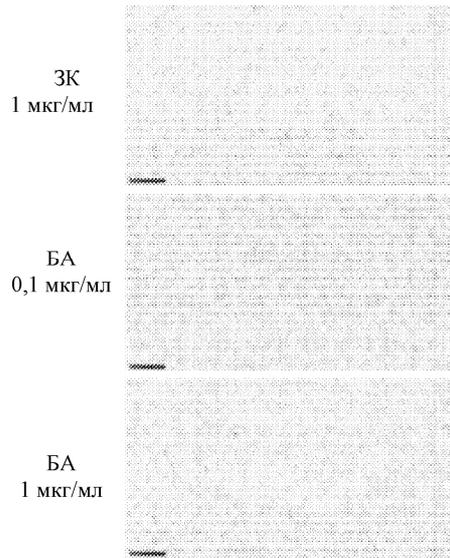


Фиг. 21



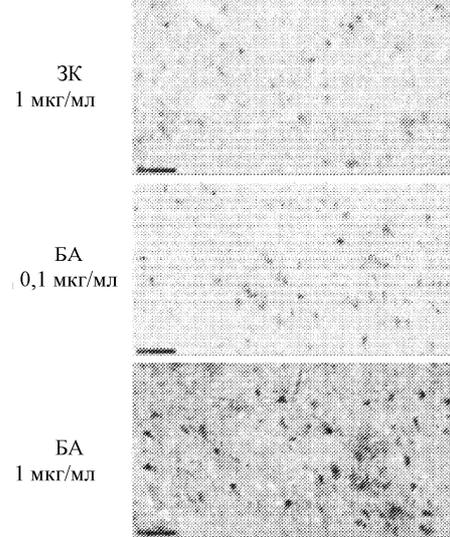
Фиг. 22

Контрольное антитело



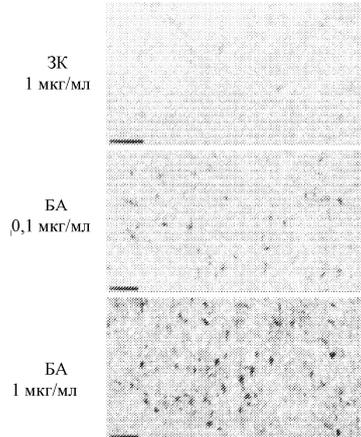
Фиг. 23А

2D11

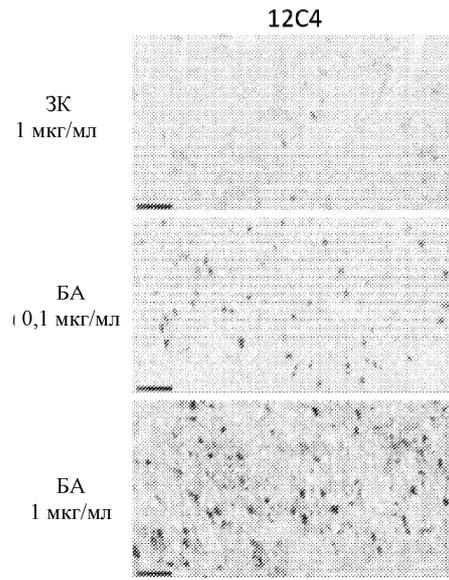


Фиг. 23В

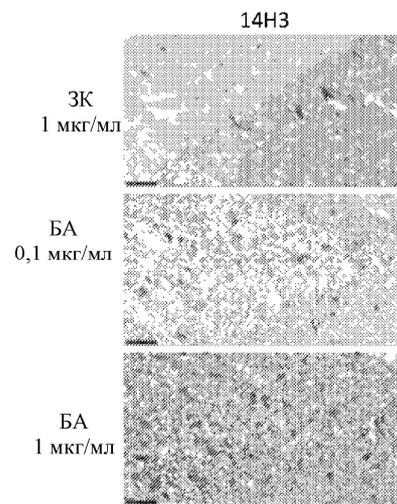
9F5



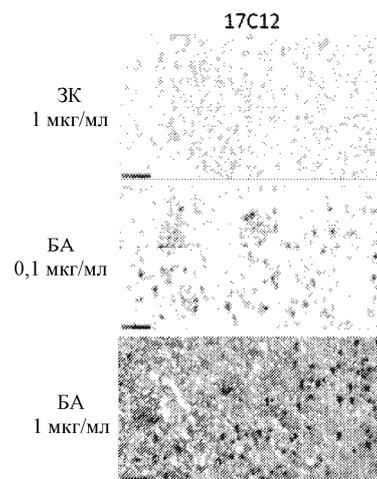
Фиг. 23С



Фиг. 23D



Фиг. 23E



Фиг. 23F

	10	20	30	
m9F5VH	E V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V K L S C T A S G F N I K D D Y M N			38
m10C12VH				38
m2D11VH				38
m12C4VH				38
m14H3VH	Q T R K P F G I L Q S Q T L S T S F S L S T G G V G I R			40
m17C12VH	K I		A	38
	40	50	60	70
m9F5VH	Q R P E R G L E W I G	W I D P E N G D T E Y A S K F Q G K A T M T A D T S S		76
m10C12VH				76
m2D11VH				76
m12C4VH				76
m14H3VH	P S G K L A N I W D I K	Y N A A L X S R L I S K K		77
m17C12VH			K	76
	80	90	100	110
m9F5VH	N T A Y L Q F S S L T S E D T A V Y Y C T T S N G	W G Q G T L V T V S T		112
m10C12VH				112
m2D11VH				112
m12C4VH				112
m14H3VH	Q V F X I A V D T A	T A R N V D Y	T L S	114
m17C12VH				112

Фиг. 24

	10	20	30	40	
m9F5VL	D I V M T Q A A F S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W				40
m10C12VL					40
m2D11VL					40
m12C4VL					40
m14H3VL	V T P L L S D Q Q V N F H				40
m17C12VL	V T P L T L S I Q P T Q				40
	50	60	70	80	
m9F5VL	Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P D R F S S S G S G T D F T L R I				80
m10C12VL					80
m2D11VL					80
m12C4VL					80
m14H3VL	K K V R F G K				80
m17C12VL	L R K L V K E G K				80
	90	100	110		
m9F5VL	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G A G T K L E L K				112
m10C12VL					112
m2D11VL					112
m12C4VL					112
m14H3VL	L F S S T L V W G I				112
m17C12VL	L L T H F R G I				112

Фиг. 25

