

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047298**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.06.27**

(21) Номер заявки  
**202292831**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.04.07**

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)

---

(54) **АНТИТЕЛА К РНФ-ТАУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) **63/007,118; 63/026,387**

(32) **2020.04.08; 2020.05.18**

(33) **US**

(43) **2023.01.25**

(86) **РСТ/IB2021/052890**

(87) **WO 2021/205359 2021.10.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Ван Волен Кристоф, Меркен Марк  
(BE), Нанджунда Рупеш, Сингх  
Санджая, Ла Порте Шерри, Ло  
Цзиньцюань, Джайпрасарт Пхарави,  
Венкатарамани Сатхьядеви, Ганешан  
Раджкумар (US)**

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

(56) **US-A1-20180265575  
US-A1-20180194832**

---

(57) Описаны моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты к РНФ-тау. Также описаны кодирующие антитела нуклеиновые кислоты, композиции, содержащие антитела, способы получения антител и применения антител для лечения или профилактики таких патологических состояний как таупатия.

---

**B1**

**047298**

**047298**

**B1**

### Перекрестные ссылки на смежные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета по заявке на патент США № 63/007,118, поданной 08 апреля 2020 г., и заявке на патент США № 63/026,387, поданной 18 мая 2020 г.

### Область применения изобретения

Данное изобретение относится к антителам к РНФ-тау, нуклеиновым кислотам и экспрессионным векторам, кодирующим такие антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим такие векторы, и композициям, содержащим такие антитела. Также предложены способы получения антител, способы применения антител для лечения патологических состояний, включая таупатии, и способы применения антител для диагностики заболеваний, таких как таупатия.

### Ссылка на перечень последовательностей, поданный в электронном виде

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который подается в электронном виде посредством EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла JBI6174WOPCT1SL и датой создания 02 апреля 2021 г., размер 169953 байт. Перечень последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

### Предпосылки создания изобретения

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой дегенеративное расстройство мозга, клинически характеризуемое прогрессирующей потерей памяти, когнитивных функций, способности к рассуждению, принятию решений и эмоциональной устойчивости, что постепенно приводит к глубокому умственному нарушению и в конечном итоге смерти. БА является очень частой причиной прогрессирующего умственного угасания (деменции) у пожилых людей и считается четвертой по частоте медицинской причиной смерти в США. БА наблюдается в различных этнических группах по всему миру и является сегодня и останется в будущем одной из основных проблем здравоохранения.

В мозге пациентов с БА наблюдаются характерные повреждения, называемые сенильными (или амилоидными) бляшками, амилоидной ангиопатией (амилоидными отложениями в кровеносных сосудах) и нейрофибриллярными клубками. У пациентов с БА обычно обнаруживают большие количества таких повреждений, в особенности амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков из парных спиральных филаментов, в нескольких областях мозга человека, важных для памяти и когнитивных функций.

На данный момент лечение БА включает только лекарственные препараты, одобренные для лечения когнитивных симптомов у пациентов с деменцией. Не существует одобренных лекарственных препаратов, которые модифицируют или замедляют прогрессирование БА. Потенциальные модификаторы заболевания включают гуманизованное моноклональное антитело к Аβ, соланезумаб, от компании Eli Lilly для пациентов с легкой БА и низкомолекулярный ингибитор BACE, верубецестат, от компании Merck для пациентов с БА от легкой до умеренной степени. Эти лекарственные препараты и большинство других потенциальных модификаторов заболевания, которые могут выпускаться в следующем десятилетии, нацелены на Аβ (главный компонент амилоидных бляшек, которые являются одним из двух "отличительных" патологических признаков БА).

Нейрофибриллярные клубки, второй отличительный патологический признак БА, главным образом состоят из агрегатов гиперфосфорилированного тау-белка. Главной физиологической функцией тау-белка является полимеризация и стабилизация микротрубочек. Связывание тау-белка с микротрубочками происходит за счет ионных взаимодействий между положительными зарядами в области связывания тау-белка с микротрубочками и отрицательными зарядами на сетке микротрубочек (Butner and Kirschner, *J Cell Biol.* 115(3):717-30, 1991). Тау-белок содержит 85 возможных сайтов фосфорилирования, а фосфорилирование по многим из этих сайтов препятствует основной функции тау-белка. Тау-белок, связанный с сеткой аксональных микротрубочек, находится в состоянии гипофосфорилирования, тогда как агрегированному тау-белку при БА свойственны гиперфосфорилированность и формирование уникальных эпитопов, отличающихся от физиологически активного пула тау-белка.

Описана гипотеза о передаче и распространении таупатии, и она основана на стадиях развития в человеческом мозге таупатии по Брауку и таупатии, распространяющейся после инъекций агрегатов тау-белка в доклинических моделях таупатии (Frost et al., *J Biol Chem.* 284:12845-52, 2009; Clavaguera et al., *Nat Cell Biol.* 11:909-13, 2009).

Разработка терапевтических средств для профилактики или противодействия агрегации тау-белка уже многие годы вызывает большой интерес и потенциальные препараты, включая противодействующие агрегации соединения и ингибиторы киназы, достигли стадии клинических испытаний (Brunden et al., *Nat Rev Drug Discov.* 8:783-93, 2009). Были опубликованы несколько исследований, которые демонстрируют полезные терапевтические эффекты как активной, так и пассивной иммунизации тау-белком в моделях трансгенных мышей (Chai et al., *J Biol Chem.* 286:34457-67, 2011; Boutajangout et al., *J Neurochem.* 118:658-67, 2011; Boutajangout et al., *J Neurosci.* 30:16559-66, 2010; Asuni et al., *J Neurosci.* 27:9115-29, 2007). Сообщалось об активности как фосфонаправленных, так и нефосфонаправленных антител (Schroeder et al., *J Neuroimmune Pharmacol.* 11(1):9-25, 2016).

Несмотря на прогресс, остается потребность в эффективных терапевтических средствах, которые

предотвращают агрегацию тау-белка и прогрессирование таупатии для лечения таупатий, таких как БА, и других нейродегенеративных заболеваний.

#### Краткое изложение сущности изобретения

Изобретение удовлетворяет эту потребность, предоставляя антитела к РНФ-тау или их антигенсвязывающие фрагменты, которые имеют высокую аффинность связывания к парным спиральным филаментам (РНФ)-Тау, и являются селективными для фосфорилированного тау-белка. Антитела настоящего изобретения были получены с помощью адаптированных для человеческого каркаса (НФА) мышинных специфических антител к РНФ-тау. Считается, что селективность антител для фосфорилированного тау-белка обеспечивает эффективность против патогенного тау-белка без нарушения нормальной функции тау-белка. В данном изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, композиции, содержащие такие антитела, и способы получения и применения таких антител. Антитела к РНФ-тау или их антигенсвязывающие фрагменты настоящего изобретения ингибируют агрегаты тау-белка, что измерено с помощью клеточных анализов с использованием агрегатов тау-белка, полученных из лизатов клеток НЕК или из лизатов спинного мозга от мутантных тау-трансгенных мышей. Кроме того, химерное антитело с переменными областями антител к РНФ-тау настоящего изобретения и константными областями Ig мыши, такими как константные области IgG2a мыши, блокируют активность агрегирования *in vivo* мутантной тау-трансгенной мышинной модели.

Прогрессирование таупатии в головном мозге при БА происходит по определенным закономерностям пространственным распространения. Было показано, что в доклинических моделях внеклеточные агрегаты фосфо-тау-белка могут индуцировать таупатию в нейронах (Clavaguera et al., PNAS 110(23):9535-40, 2013). Таким образом, считается, что таупатия может распространяться подобно прионам от одной области головного мозга к другой. Этот процесс распространения может включать в себя экстернализацию агрегатов тау-белка, которые могут захватываться близлежащими нейронами и могут индуцировать дальнейшую таупатию. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, считается, что антитела к РНФ-тау или их антигенсвязывающие фрагменты настоящего изобретения предотвращают агрегацию тау-белка или распространение таупатии в головном мозге путем взаимодействия с агрегатами фосфо-тау-белка.

В одном общем аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с РНФ-тау. В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой гуманизованное моноклональное антитело.

В соответствии с одним конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 71, 45, 51, 57, 63, 69, 39, 41, 43, 47, 49, 53, 55, 59, 61, 65 или 67, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 72, 46, 52, 58, 64, 70, 40, 42, 44, 48, 50, 54, 56, 62, 66 или 68, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с парными спиральными филаментами (РНФ)-Тау, предпочтительно РНФ-тау человека.

В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

- a) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 71, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 72;
- b) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 45, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 46;
- c) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 51, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 52;
- d) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 57, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 58;
- e) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 63, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 64;
- f) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 69, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 70;
- g) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 40;
- h) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 41, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 42;
- i) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 43, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 44;
- j) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 47, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 48;
- k) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 50;
- l) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 53,

и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 54;

m) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 55, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 56;

n) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 59, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 60;

o) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 61, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 62;

p) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 65, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 66; или

q) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 68.

В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

a) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 38;

b) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

c) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;

d) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24;

e) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 30;

f) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 35, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 36;

g) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

h) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

i) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;

j) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

k) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;

l) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20;

m) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22;

n) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26;

o) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 27, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28;

p) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 32; или

q) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34.

В другом общем аспекте данное изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения.

В другом общем аспекте данное изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения.

В другом общем аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу снижения патологической агрегации таубелка или распространения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящего изобретения.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения таупатии у субъекта, нуждаю-

шегося в этом, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящего изобретения. Таупатия включает в себя, без ограничений, одно или более заболеваний, выбранных из группы, состоящей из семейной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего супрануклеарного пареза зрения, кортикобазальной дегенерации, синдрома Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции, характеризующейся появлением аргирофильных зерен, комплекса амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдрома Дауна, синдрома Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, синдрома Галлервордена - Шпатца, миозита с включениями, болезни Крейтцфельда - Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна - Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (деменции боксеров).

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента dementia настоящего изобретения, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую такое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, подходящих для получения такого моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение такого моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры.

В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу обнаружения присутствия фосфорилированных RHF-тау у субъекта или способу диагностирования таупатии у субъекта путем обнаружения присутствия RHF-тау у субъекта с применением моноклонального антитела настоящего изобретения или его антигенсвязывающего фрагмента.

Другие аспекты, признаки и преимущества изобретения станут очевидны из представленного ниже описания, включающего подробное описание изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления, и прилагаемой формулы изобретения.

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

Предшествующее краткое изложение, а также последующее подробное описание изобретения станут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми графическими материалами. Необходимо понимать, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

На фиг. 1 показано схематическое изображение процесса гуманизации.

На фиг. 2A-2AI показаны профили поверхностного плазмонного резонанса для оценки связывания с фосфопептидом NPT-6 с регуманизированными Fab PT3, полученными из супернатантов трансфицированных клеток E.coli.

На фиг. 3 показан график, демонстрирующий связывание mAb с пептидом pT217+ в прямом эксперименте твердофазного ИФА. Для сравнения добавляли профиль связывания исходного PT3 из PT1B296 (т.е. вариант, полученный предыдущей гуманизацией (публикация патента США № 2018/0265575)).

На фиг. 4A-I показаны репрезентативные данные SPR связывания mAb и фрагментов Fab выбранных регуманизированных вариантов, PT3 и PT1B296, с пептидом NPT6.

На фиг. 5A-F показаны репрезентативные данные SPR связывания фрагментов Fab выбранных регуманизированных вариантов, PT3 и PT1B296, с RHF.

На фиг. 6A-H показаны данные перекрестной реактивности для белков разных биологических видов, полученных из выбранных регуманизированных вариантов, PT3 и PT1B296, определенные с помощью анализа вестерн-блоттинга на гомогенатах головного мозга от мыши WT (полоса 1), мыши KO (полоса 2), крысы (полоса 3), собаки (полоса 4), минисвиньи (полоса 5), мартышки (полоса 6), яванского макака (полоса 7) и человека (термостабильный экстракт из головного мозга человека без БА (полоса 8); и RHF, полученных из головного мозга больного БА (стадия VI по Брааку) (полоса 9)). Обнаружение с HRPO-меченым PT9 (Vandermeeren et al., J. Alzheimers Dis. 65(1):265-81 (2018)) было проведено для оценки сигналов общего тау-белка в различных экстрактах. Фиг. 6A: PT3 hIgG1; фиг. 6B: PT1B296; фиг. 6C: PT1B844; фиг. 6D: PT1B847; фиг. 6E: PT1B856; фиг. 6F: PT1B850; фиг. 6G: PT1B333; и фиг. 6H: PT9-HRPO.

На фиг. 7A-C показаны данные связывания для mAb из выбранных регуманизированных вариантов, PT3, и PT1B296, на криосрезах головного мозга больного БА и субъекта, у которого отсутствует БА.

На фиг. 8A, B показана эффективность выбранных регуманизированных вариантов, PT3, и PT1B296, в клеточной модели с использованием анализа FRET, как описано на фиг. 8A. График на фиг. 8B указывает на % оставшегося агрегирования в зависимости от увеличения концентраций антител,

добавляемых к агрегатам тау-белка, полученных из головного мозга больных БА.

На фиг. 9A-D показана эффективность РТ1В844, РТ1В296 и РТ3 в модели с инъекциями ePHF (см., например, публикацию патента США № 2018/0265575) после совместного введения.

На фиг. 10A, В показана эффективность регуманизированных вариантов, РТ1В296 и РТ3, в ex vivo модели вовлечения эпитопа рТ217+ (см., например, публикацию патента США № 2019/0271710).

На фиг. 11 показаны данные ФК в плазме и СМЖ для РТ1В844/РТ1В916 после однократной дозы у яванского макака.

### Подробное описание изобретения

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

### Определения

Все технические и научные термины в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в описании. Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, процитированные в настоящем документе, включены в него путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе.

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

Если не указано иное, любое числовое значение, такое как концентрация или диапазон концентраций, описанное в настоящем документе, следует понимать как модифицированное во всех случаях термином "около". Таким образом, числовое значение, как правило, включает  $\pm 10\%$  от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1% до 10% (мас./об.) включает от 0,9% (мас./об.) до 11% (мас./об.). В настоящем документе применение числового диапазона явным образом включает в себя все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

Используемый в настоящем документе термин "выделенный" означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был по существу отделен, получен отдельно или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т.е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были "выделены", включают в себя нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. "Выделенные" нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если такая композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также включает в себя нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

В контексте данного документа термин "антитело" или "иммуноглобулин" используется в широком значении и относится к молекулам иммуноглобулинов или антител, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела включая мышинные, человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела и фрагменты антитела.

В целом антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые демонстрируют специфичность связывания с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоформы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела согласно данному изобретению могут быть из любого из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Антитела изобретения предпочтительно представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитела настоящего изобретения включают в себя те, которые имеют вариации в своей области Fc таким образом, что они имеют измененные свойства по сравнению с областями Fc дикого типа, включая, без ограничений, увеличенный период полувыведения, уменьшенную или увеличенную ADCC или CDC, а также сайленсированные эффекторные функции Fc. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно, каппа и ламбда. Соответственно, антитела изобретения могут содержать константный домен легкой цепи каппа или ламбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела изобретения включают константные области тяжелой и/или легкой цепи, мышинных антител или человеческих антител.

В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепей антитела содержатся переменные области легкой и тяжелой цепей. Переменная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из "каркасной" области, прерываемой "антигенсвязывающими сайтами". Антигенсвязывающие сайты определяют с использованием различных терминов и схем нумерации, описанных ниже.

(i) Kabat: "Определяющие комплементарность области" или "CDR" основаны на изменчивости последовательности (Wu and Kabat, *J Exp Med.* 132:211-50, 1970). Антигенсвязывающий участок по существу имеет три CDR в каждой переменной области (например, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в переменной области тяжелой цепи (VH) и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в переменной области легкой цепи (VL)).

(ii) Chothia: Термин "гиперпеременная область", "HVR" или "HV", относится к областям переменного домена антитела, которые гиперпеременчивы по структуре согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, *J Mol Biol.* 196:901-17, 1987). Антигенсвязывающий сайт по существу имеет по три гиперпеременные области в каждой из переменных областей тяжелой цепи VH (H1, H2, H3) и легкой цепи VL (L1, L2, L3). Системы нумерации, а также аннотации CDR и HV были пересмотрены Abhinandan и Martin (Abhinandan and Martin, *Mol Immunol.* 45:3832-9, 2008).

(iii) IMGT: другое определение областей, образующих антигенсвязывающий сайт, было предложено Lefranc (Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* 27:55-77, 2003), на основании сравнения V-доменов иммуноглобулинов и T-клеточных рецепторов. В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) представлены стандартизированная нумерация и определение этих областей. Соответствие между разграничениями CDR, HV и IMGT описано Lefranc et al., 2003, Id.

(iv) AbM: Компромисс между схемами нумерации Kabat и Chotia представляет собой соглашение по нумерации AbM, описанное Martin (Martin ACR (2010) *Antibody Engineering*, eds Kontermann R, Dubel S (Springer-Verlag, Berlin), Vol 2, pp 33-51).

(v) Антигенсвязывающий сайт может также быть определен по "Specificity Determining Residue Usage" (SDRU) (Almagro, *Mol Recognit.* 17:132-43, 2004), в которой в качестве SDR представлены аминокислотные остатки иммуноглобулина, которые непосредственно участвуют в контакте с антигеном. Термины "каркас" или "каркасные последовательности" представляют собой оставшиеся последовательности переменной области антитела, которые отличаются от тех, которые определены как антигенсвязывающие сайты. Поскольку конкретное определение антигенсвязывающего сайта может быть сформулировано на основе разных признаков, как описано выше, конкретная каркасная последовательность зависит от определения антигенсвязывающего сайта. Каркасные области (FR) представляют собой более высоко консервативные участки переменных доменов. Каждый из переменных доменов нативной тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR (соответственно FR1, FR2, FR3 и FR4), которые по существу принимают конфигурацию бета-листов, соединенных тремя гиперпеременными петлями. Гиперпеременные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости при помощи FR и, вместе с гиперпеременными петлями из другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой участка связывания, образованного определяющими комплементарность областями (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 227: 799-817, 1992; Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215:175-182, 1990). Несмотря на высокую изменчивость последовательности пять из шести петель имеют лишь небольшой набор конформаций основной цепи, называемый "каноническими структурами". Эти конформации, во-первых, определяются длиной петель и, во-вторых, наличием ключевых остатков в определенных положениях в петлях и в каркасных областях, которые определяют конформацию посредством их упаковки, водородных связей или способности принимать необычные конформации основной цепи.

При использовании в данном документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, фрагмент Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, стабилизированный дисульфидными связями фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное антитело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, верблюжье однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полной структуры антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает возможностью связывания с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и Fd-сегмент константной области тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

В настоящем документе термин "гуманизованное антитело" относится к нечеловеческому антителу, которое модифицировано для увеличения гомологии последовательности с последовательностью антитела человека, так что антигенсвязывающие свойства антитела сохраняются, но его антигенность в человеческом теле уменьшается.

При использовании в настоящем документе термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, расположенных рядом друг с другом в результате третичной укладки белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются под воздействием денатурирующих растворителей, тогда как структура эпитопов, образованных в результате третичной укладки, как правило, нарушается при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

В настоящем документе термин "тау" или "тау-белок" относится к встречающемуся в избытке белку центральной и периферической нервной системы, имеющему множество изоформ. В центральной нервной системе (CNS) человека существует шесть основных изоформ тау-белка, имеющих длину от 352 до 441 аминокислот, обусловленных альтернативным сплайсингом (Hanger et al., *Trends Mol Med.* 15:112-9, 2009). Изоформы отличаются друг от друга регулируемым включением 0-2 N-концевых вставок и 3 или 4 tandemно организованных повторов связывания с микротрубочками и получили названия 0N3R (SEQ ID NO: 73), 1N3R (SEQ ID NO: 74), 2N3R (SEQ ID NO: 75), 0N4R (SEQ ID NO: 76), 1N4R (SEQ ID NO: 77) и 2N4R (SEQ ID NO: 78). В настоящем документе термин "контрольный тау-белок" относится к изоформе тау-белка с SEQ ID NO: 78, в которой отсутствуют фосфорилирование и другие посттрансляционные модификации. В настоящем документе термин "тау-белок" включает белки, содержащие мутации, например точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и варианты сплайсинга полноразмерного тау-белка дикого типа. Термин "тау-белок" включает также пост-трансляционные модификации аминокислотной последовательности тау-белка. К пост-транскрипционной модификации относится, без ограничений, фосфорилирование.

Тау-белок связывается с микротрубочками и регулирует транспорт карго через клетки, процесс, который можно модулировать фосфорилированием тау-белка. В БА и связанных расстройствах аномальное фосфорилирование тау-белка является доминирующим и считается предшественником и/или инициатором агрегации тау-белка в фибриллы, получившие название парных спиральных филаментов (PHF). Основным компонентом PHF является гиперфосфорилированный тау-белок. В контексте настоящего документа термин "тау парных спиральных филаментов" или "PHF-тау" относится к тау-агрегатам в парных спиральных филаментах. В электронной микроскопии явно проявляются две основные области в структуре PHF: рыхлая оболочка и центральный филамент; при этом рыхлая оболочка чувствительна к протеолизу и расположена снаружи филаментов, а устойчивое к протеазе ядро филаментов образует каркас PHF (Wischik et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:4884-8, 1988).

Под "выделенным гуманизированным антителом, которое связывается с PHF-тау", или "выделенным гуманизированным антителом к PHF-тау" в настоящем документе подразумевается гуманизированное антитело к PHF-тау, которое по существу не содержит других антител со специфичностями к другим антигенам (например, выделенное гуманизированное антитело к PHF-тау по существу не содержит антител, специфически связывающих антигены, отличные от PHF-тау). Однако выделенное гуманизированное антитело к PHF-тау может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например антигенами других биологических видов (например, видовыми гомологами PHF-тау).

В контексте настоящего документа термин "специфически связывается" или "специфическое связывание" относится к способности антитела к PHF-тау изобретения связываться с предварительно заданной мишенью с константой диссоциации (KD) около  $1 \times 10^{-6}$  М или прочнее, например около  $1 \times 10^{-7}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-12}$  М или менее, или около  $1 \times 10^{-13}$  М или менее. KD представляет собой отношение  $K_d$  к  $K_a$  (т.е.  $K_d/K_a$ ) и выражается в молярной концентрации (М). Значения KD для антител можно определять с помощью способов данной области техники, относящихся к настоящему описанию. Например, значение KD для антитела к PHF-тау может быть определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например с помощью биосенсорной системы, например прибора Biacore®, прибора Proteon (BioRad), прибора KinExA (Sapidyne), твердофазного ИФА или анализов конкурентного связывания, известных специалистам в данной области. Как правило, антитело к PHF-тау связывается с предварительно заданной мишенью (т.е. PHF-тау) с  $K_D$ , которая по меньшей мере в десять раз меньше его  $K_D$  для неспецифической мишени по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например, прибора ProteOn (BioRad). Однако антитела к PHF-тау, специфически связывающиеся с PHF-тау, могут иметь перекрестную реактивность с другими родственными мишенями, например с той же предварительно заданной мишенью, но от другого биологического вида (гомологи).

В настоящем документе термин "полинуклеотид", который является синонимом термина "молекула нуклеиновой кислоты", "нуклеотиды" или "нуклеиновые кислоты", относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. "Полинуклеотиды" включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей,



одно- и двухцепочечные РНК, РНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей, слитые молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, "полинуклеотидом" называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин "полинуклеотид" также включает ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей. "Модифицированные" основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин "полинуклеотид" охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин "полинуклеотид" также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

В настоящем документе термин "вектор" представляет собой репликон, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так, чтобы происходила репликация или экспрессия сегмента.

В настоящем документе термин "клетка-хозяин" относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты изобретения. Термин "клетка-хозяин" может относиться к любому типу клетки, например к первичной клетке, клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В одном варианте осуществления "клетка-хозяин" представляет собой клетку, трансфицированную молекулой нуклеиновой кислоты изобретения. В другом варианте осуществления "клетка-хозяин" представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или воздействий окружающей среды, которые могут происходить в последующих поколениях, или из-за интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

Термин "экспрессия" в настоящем документе обозначает биосинтез продукта гена. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывает все посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения. Экспрессированное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с РНФ-тау, может находиться в цитоплазме клетки-хозяина во внеклеточной среде, такой как питательная среда для клеточной культуры, или быть прикрепленным к клеточной мембране.

В контексте настоящего документа термин "носитель" относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солнобилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. В контексте настоящего документа термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не оказывает негативное влияние на эффективность композиции в соответствии с настоящим изобретением или биологической активностью композиции в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с конкретными вариантами осуществления в свете настоящего описания в настоящем изобретении можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, приемлемый для применения в фармацевтической композиции на основе антитела.

Используемый в данном документе термин "субъект" относится к животному, предпочтительно к млекопитающему. В соответствии с конкретными вариантами осуществления субъект представляет собой млекопитающее, включая млекопитающих, отличных от приматов (например, верблюда, осла, зебру, корову, свинью, лошадь, козу, овцу, кошку, собаку, крысу, кролика, морскую свинку или мышь) или приматов (например, обезьяну, шимпанзе или человека). В конкретных вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к некоторому количеству активного ингредиента или компонента, которые индуцируют желаемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели. Например, для определения диапазона оптимальной дозы могут необязательно быть использованы анализы *in vitro*. Подбор конкретной эффективной дозы может выполнить (например, путем клинических исследований) специалист в данной области с учетом нескольких факторов, включая подлежащее лечению или профилактике заболевание, симптомы, массу тела пациента, состояние иммунной системы пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области. Точная доза, предназначенная для применения в составе, также зависит от способа введения и степени тяжести заболевания и должна быть определена на основании решения медработника и состояния каждого пациента. Эффективные дозы можно рассчитать на кривых дозовой зависимости, полученных в тестовых системах *in vitro* или животных моделях.

В контексте данного документа термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к облегчению или возврату в исходное состояние по меньшей мере одного измеряемого физического параметра, относящегося к таупатии, который не обязательно виден у субъекта, но может быть видимым у субъекта.

Термины "лечить", "лечащий" и "лечение" могут также обозначать индуцирование регрессии, профилактику прогрессирующего или по меньшей мере замедление прогрессирующего заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к облегчению, профилактике развития или появления или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с таупатией. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к профилактике рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к повышению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

При применении в настоящем документе термин "таупатия" охватывает любые нейродегенеративные заболевания, которые связаны с патологической агрегацией тау-белка в мозге. Наряду с семейной и спорадической БА к другим примерам таупатии относятся лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий супрануклеарный парез зрения, кортикобазальная дегенерация, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменция с аргирофильными зернами, комплекс амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдром Дауна, болезнь Герстманна-Штреусслера - Шейнкера, болезнь Галлервордена - Шпатца, миозит с тельцами включения, болезнь Крейтцфельда - Якоба, множественная системная атрофия, болезнь Ниманна - Пика типа С, церебральная амилоидная ангиопатия с прионными белками, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническая дистрофия, негуамская мотонейронная болезнь с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитный паркинсонизм и хроническая травматическая энцефалопатия, такая как *dementia pugilistica* (деменция боксеров) (Morris et al., *Neuron*, 70:410-26, 2011).

При использовании в данном документе термин "в комбинации" в контексте введения субъекту двух или более лекарственных средств относится к применению более одной терапии. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок введения лекарственных средств субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, описанную в настоящем документе композицию) можно вводить перед введением (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго терапевтического средства субъекту или одновременно с таким введением.

#### Антитела к РНФ-тау

В одном общем аспекте изобретение относится к выделенному моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с РНФ-тау. Такие антитела анти-РНФ-Тау могут обладать свойством связываться с фосфорилированным эпитопом на РНФ-тау или связываться с нефосфорилированным эпитопом на РНФ-тау. Антителам к РНФ-тау могут найти применение в качестве терапевтических агентов и в качестве исследовательских или диагностических реагентов для определения РНФ-тау в биологических пробах, например в тканях или клетках.

В соответствии с одним конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизованному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с фосфорилированным тау-белком в эпитопе в пролин-богатом домене тау-белка. В одном более конкретном аспекте изобретение относится к выделенному гуманизованному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с фосфорилированным тау-белком в эпитопе, содержащем фосфорилированные остатки T212 и/или T217.

Гуманизованные антитела имеют каркасные остатки переменной области, по существу полученные из человеческого антитела (называемого акцепторным антителом) и определяющие комплементарность областей по существу из нечеловеческого антитела (т.е. антитела мыши), (называемого донором иммуноглобулина). См. Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:10029-10033, 1989, WO 90/07861, US 5693762, US 5693761, US 5585089, US 5530101 и US 225539. Константная(ые) область(и), если присутствует(ют), также получена(ы) по существу или полностью из человеческого иммуноглобулина. Переменные домены человека обычно выбирают из человеческих антител, каркасные последовательности которых проявляют высокую степень идентичности последовательности с доменами переменной области мыши, из которых были получены CDR. Каркасные остатки переменной области тяжелой и легкой цепи могут быть получены из одинаковых или различных последовательностей антител человека. Последовательности антител человека могут представлять собой последовательности встречающихся в природе человеческих антител или могут быть консенсусными последовательностями нескольких человеческих антител. См., например, публикацию международной патентной заявки № WO 92/22653. Некоторые аминокислоты из каркасных остатков переменной области человека выбирают для замены на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных воздействий осуществляется путем моделирования, изучения характеристик аминокислот.

кислот в конкретных местоположениях или эмпирического наблюдения за эффектами замены или мутагенеза конкретных аминокислот.

Например, когда аминокислота отличается у каркасного остатка варибельной области мыши и выбранного каркасного остатка варибельной области человека, аминокислота каркасной области человека обычно должна быть замещена эквивалентной аминокислотой каркасной области из антитела мыши, когда разумно ожидать, что аминокислота: (1) нековалентно связывает антиген напрямую, (2) является смежной с областью CDR, (3) иным образом взаимодействует с областью CDR (например, находится в пределах около 6 ангстрем в области CDR), или (4) участвует в поверхностном взаимодействии VL-VH.

Другие кандидаты для замены представляют собой акцепторные аминокислоты каркасной области человека, которые являются необычными для человеческого иммуноглобулина в этом положении. Эти аминокислоты могут быть замещены аминокислотами из эквивалентного положения донорного антитела мыши или из эквивалентных положений более типичных для человеческих иммуноглобулинов. Другие кандидаты для замены представляют собой акцепторные аминокислоты каркасной области человека, которые являются необычными для человеческого иммуноглобулина в этом положении. Каркасы варибельной области гуманизированных иммуноглобулинов обычно демонстрируют по меньшей мере 85% идентичности с каркасной последовательностью варибельной области человека или консенсус таких последовательностей.

Гуманизацию антитела можно осуществлять с помощью хорошо известных способов, таких как перестройка определяющих специфичность остатков (SDRR) (US 2010/0261620), изменение поверхности (Padlan et al., *Mol. Immunol.* 28:489-98, 1991), супер гуманизация (WO 04/006955) и оптимизация содержимого строки (гена) человека (US 7657380). Специалисты в данной области могут выбрать пригодные для прививки или гуманизации каркасные последовательности человека из соответствующих баз данных. Выбранные каркасы могут быть дополнительно модифицированы для сохранения или усиления аффинности связывания с помощью методик, таких как описанные в Queen et al., 1989, Id. Согласно конкретным вариантам осуществления способы гуманизации антител к PHF-тау из родительских антител мыши включают описанные в примерах ниже.

Антитела настоящего изобретения могут быть получены с помощью различных методик, например с помощью метода гибридомы (Kohler and Milstein, *Nature.* 256:495-7, 1975). Химерные моноклональные антитела, содержащие варибельную область легкой цепи и тяжелой цепи, полученные из донорского антитела (как правило, мышиноного) в комбинации с константными областями легкой и тяжелой цепей, полученными из акцепторного антитела (как правило, другого вида млекопитающих, такого как человек), могут быть получены способом, описанным в US 4816567. Моноклональные антитела с привитой областью CDR, имеющие CDR из донорского иммуноглобулина, не относящегося к человеку (как правило, мышиноного), и оставшиеся производные от иммуноглобулина части молекулы, происходящие от одного или более иммуноглобулинов человека, могут быть получены методиками, известными специалистам в данной области, такими как описанные в US 5225539. Полностью человеческие моноклональные антитела, в которых отсутствуют какие-либо нечеловеческие последовательности, можно получать из трансгенных по человеческим иммуноглобулинам мышей по методикам, описанным Lonberg et al., *Nature.* 368:856-9, 1994; Fishwild et al., *Nat Biotechnol.* 14:845-51, 1996; и Mendez et al., *Nat Genet.* 15:146-56, 1997. Человеческие моноклональные антитела также могут быть получены и оптимизированы из библиотек фаговых дисплеев (см., например, Knappik et al., *J Mol Biol.* 296:57-86, 2000; Krebs et al., *J Immunol Methods.* 254:67-84, 2001; Shi et al., *J Mol Biol.* 397:385-96, 2010).

В данном документе предложены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 71, 45, 51, 57, 63, 69, 39, 41, 43, 47, 49, 53, 55, 59, 61, 65 или 67, или варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 72, 46, 52, 58, 64, 70, 40, 42, 44, 48, 50, 54, 56, 62, 66 или 68, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с парными спиральными филаментами (PHF)-Тау, предпочтительно PHF-тау человека.

В соответствии с одним конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим

- a) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 71, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 72;
- b) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 45, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 46;
- c) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 51, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 52;
- d) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 57, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 58;
- e) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 63, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 64;
- f) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 69,



фрагмент связывается с РНФ-тау человека с константой диссоциации ( $K_D$ )  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, предпочтительно  $K_D$   $1 \times 10^{-9}$  М или менее или  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, при этом  $K_D$  измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы Biacore или ProteOn.

Функциональная активность гуманизированных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с РНФ-тау, может быть охарактеризована способами, известными в данной области техники и описанными в данном документе. Способы определения характеристик антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с РНФ-тау, включают, но не ограничиваются ими, анализы аффинности и специфичности, включая анализ Biacore, твердофазный ИФА и цитометрию посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS), иммуногистохимический анализ; анализы клеток *in vitro* и анализы с инъекциями *in vivo* для определения эффективности антител при ингибировании агрегирования тау-белка; анализы на клеточную цитотоксичность для обнаружения наличия антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) и активности комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) антител; и т.д. В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы определения характеристик антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с РНФ-тау, включают способы, описанные в приведенных ниже примерах. Пример исходного антитела мыши гуманизированных антител, связывающих РНФ-тау, но не контрольный тау-белок, представляет собой антитело РТЗ, которое имеет вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 2 (см. патент США № 9,371,376, который полностью включен в настоящее описание путем ссылки).

Для определения связывания эпитопа антител настоящего изобретения могут быть задействованы несколько хорошо известных методологий. Например, в случае, когда известны структуры обоих отдельных компонентов, можно использовать анализ *in silico* прикрепления одного белка к другому белку для идентификации способных к взаимодействию участков. Может быть проведено замещение водорода дейтерием (H/D) в комплексе антигена и антитела для картирования участков антигена, связывающихся с антителом. Для определения местоположения важных для связывания с антителом аминокислот может быть применен сегментный и точечный мутагенез антигена. Для идентификации остатков, участвующих в образовании эпитопа и паратопа, применяется со-кристаллическая структура комплекса антитело-антиген. В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы определения связывающего эпитопа антител настоящего изобретения включают описанные в примерах ниже.

Антитела изобретения могут быть биспецифическими или мультиспецифическими. Пример биспецифического антитела может связывать два отдельных эпитопа на РНФ-тау или может связывать РНФ-тау и бета-амилоид (A $\beta$ ). Другой пример биспецифического антитела может связывать РНФ-тау и трансцитозный рецептор эндогенного гематоэнцефалического барьера, такой как инсулиновый рецептор, рецептор трансферрина, инсулиноподобный фактор роста-1 и рецептор липопroteинов. Пример антитела представляет собой антитело типа IgG1.

Иммуноэффektorные свойства антител изобретения также могут быть усилены или ослаблены за счет модификаций Fc с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области. Например, эффektorные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, понижение регуляции рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т.п., могут обеспечиваться и/или управляться модифицирующими остатками в Fc, ответственными за эти действия. Мутировавшие остатки в Fc-домене, увеличивающие период полужизни антител, могут также улучшать фармакокинетические свойства (Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* 20:685-91, 2009).

Кроме того, антитела изобретения могут быть модифицированы пост-трансляционно за счет таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или искусственная ковалентная модификация, такая как присоединение фрагментов полиэтиленгликоля или липидизация. Такие модификации могут происходить *in vivo* или *in vitro*. Например, антитела изобретения могут быть конъюгированы с полиэтиленгликолем (пэгилированы) для улучшения их фармакокинетических профилей. Конъюгация может быть выполнена методами, известными специалистам в данной области. Было показано, что конъюгация терапевтических антител с ПЭГ усиливает их фармакодинамику и при этом не изменяет функцию (Knight et al., *Platelets.* 15:409-18, 2004; Leong et al., *Cytokine.* 16:106-19, 2001; Yang et al., *Protein Eng.* 16:761-70, 2003).

В другом общем аспекте изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, путем замены, делеции, вставки и т.п.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие моноклональные гуманизированные антитела настоящего изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков. Пример выделенных полинуклеотидов представляют собой полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, содержащие тяжелую цепь и легкие цепи иммуноглобулина, описанные в

примерах (например, SEQ ID NO: 5-38), и полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, содержащие вариабельные области тяжелой цепи (VH) и вариабельные области легкой цепи (VL) (например, SEQ ID NO: 39-72). Другие полинуклеотиды, которые, принимая во внимание вырожденность генетического кода или предпочтительность применения кодонов в данной экспрессирующей системе, кодируют антитела изобретения, также находятся в пределах объема изобретения. Выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно получить с применением хорошо известных рекомбинантных или синтетических методов. Кодирующие моноклональные антитела ДНК легко выделяются и секвенируются с применением способов, известных специалистам в данной области. При получении гибридомы такие клетки могут служить источником такой ДНК. В альтернативном варианте осуществления можно использовать дисплейные методики, в которых кодирующая последовательность и продукт трансляции соединены, например библиотеки фаговых или рибосомных дисплеев.

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

В другом общем аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид, кодирующий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения. В контексте настоящего описания для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов настоящего описания можно применять любую клетку-хозяин, известную специалистам в данной области. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические клетки, бактериальные клетки, растительные клетки или клетки архей. Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышинные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, США, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают в себя линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHO-K1 SV (Lonza Biologics), CHO-K1 (ATCC CRL-61, Invitrogen) или DG44.

В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу получения моноклонального антитела настоящего изобретения или его антигенсвязывающего фрагмента, включающему культивирование клетки, содержащей полинуклеотид, кодирующий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, подходящих для получения моноклонального антитела настоящего изобретения или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с традиционными способами, известными в данной области.

#### Фармацевтические композиции и способы лечения

Антитела к РНФ-тау изобретения или их фрагменты изобретения можно использовать для лечения, уменьшения или предотвращения симптомов у пациентов с нейродегенеративным заболеванием, которое предполагает патологическую агрегацию тау-белка в мозге или таупатию, например, пациентов, страдающих от БА.

Таким образом, в другом общем аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения или уменьшения симптомов заболевания, расстройства или состояния, такого как таупатия, у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящего изобретения.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу снижения патологической агрегации тау-белка или распространения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящего изобретения.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит

терапевтически эффективное количество моноклонального антитела к РНФ-тау или его антигенсвязывающего фрагмента. Используемое в данном документе со ссылкой на гуманизированные антитела к РНФ-тау или их антигенсвязывающие фрагменты терапевтически эффективное количество означает количество моноклонального антитела к РНФ-тау или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, расстройства или состояния; предотвращение или замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния; или уменьшения или полного облегчения симптомов, связанных с иммунным заболеванием, расстройством или состоянием.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству препарата, которого достаточно для обеспечения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение серьезности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) профилактика прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) провоцирование регрессии заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) профилактика развития или появления заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) профилактика повторения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение вероятности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) снижение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) повышение выживаемости субъекта с заболеванием, расстройством или состоянием, подлежащим лечению, или связанным с ним симптомом; (x) торможение или подавление заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним у субъекта; и/или (xi) усиление или улучшение профилактического(их) или терапевтического(их) эффекта(ов) другой терапии.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или патологическое состояние, подлежащее лечению, представляет собой таупатию. В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, включает в себя, без ограничений, семейную болезнь Альцгеймера, спорадическую болезнь Альцгеймера, лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий супрануклеарный парез зрения, кортикобазальную дегенерацию, синдром Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменцию, характеризующуюся появлением аргирофильных зерен, комплекс амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдром Дауна, синдром Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, синдром Галлервордена -Шпатца, миозит с тельцами включения, болезнь Крейтцфельда - Якоба, множественную системную атрофию, болезнь Ниманна - Пика типа С, церебральную амилоидную ангиопатию с прионными белками, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническую дистрофию, негуамскую болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм, хроническую травматическую энцефалопатию или *dementia pugilistica* (деменцию боксеров).

Связанный с таупатией поведенческий фенотип включает в себя, без ограничений, нарушения когнитивных функций, ранние изменения личности и расторможенность, апатию, патологическое безволие, задержку речи, нарушение целенаправленных движений, навязчивое повторение, стереотипные движения/поведение, гиперорализм, дезорганизацию, неспособность планировать или организовать последовательные задачи, эгоизм/черствость, антисоциальные черты, отсутствие эмпатии, запинание,agrammaticкую речь с частыми парафазийными ошибками, но относительной сохранностью понимания, нарушение восприятия и трудности в подборе слов, медленно прогрессирующую неустойчивость походки, ретропульсию, застывание, частые падения, нечувствительную к леводопе аксиальную ригидность, супрануклеарный парез зрения, прямоугольные саккадические осцилляции зрения, медленные вертикальные саккады, псевдобульбарный синдром, апраксию конечностей, дистонию, кортикальную потерю чувствительности и тремор.

К подлежащим лечению пациентам относятся, без ограничений, не имеющие симптомов лица, подверженные риску БА или иной таупатии, а также пациенты, имеющие выраженные симптомы. Подлежащие лечению пациенты включают лиц, у которых имеется известный генетический риск БА, например присутствие заболевания в семейном анамнезе, или наличие генетических факторов риска в геноме. Примерами факторов риска являются мутации в белке-предшественнике амилоида (APP), особенно в положении 717 и положениях 670 и 671 (мутации Hardy и Swedish соответственно). Другими факторами риска являются мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, и в ApoE4, присутствие в семейном анамнезе гиперхолестеролемии или атеросклероза. Лиц, в настоящее время страдающих от БА, можно отличить от лиц с характерной деменцией по наличию описанных выше факторов риска. Кроме того, для выявления лиц, имеющих БА, имеется ряд диагностических тестов. Среди них - измерение уровней тау-белка и Abeta 42 в спинномозговой жидкости. Повышенный уровень тау-белка и пониженный уровень Abeta 42

указывают на наличие БА. Лиц, страдающих БА также можно диагностировать по критериям Ассоциации болезни Альцгеймера и связанных расстройств (AD and Related Disorders Association).

Антитела к РНГ-тау изобретения можно применять в качестве как терапевтических, так и профилактических средств для лечения или профилактики нейродегенеративных заболеваний, которые связаны с патологической агрегацией тау-белка, таких как БА или иные таупатии. Для не имеющих симптомов пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, приблизительно в 10, 15, 20, 25, 30 лет). Однако обычно необходимость в начале лечения не возникает, пока пациент не достигнет возраста приблизительно 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение, как правило, включает введение множества доз в течение некоторого периода времени. Ход лечения можно контролировать путем измерения ответа на терапевтический агент во времени по антителам или активированным Т-клеткам или В-клеткам. При падении ответа могут быть показаны повторные дозы.

В профилактических приложениях фармацевтические композиции или лекарственные средства вводят пациенту, уязвимому к или иным образом подверженному риску БА в количестве, достаточном для устранения или снижения риска, уменьшения степени тяжести или задержки начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, присутствующие в процессе развития заболевания. В терапевтических приложениях композиции или лекарственные средства вводят пациенту, у которого подозревается или уже подтверждено наличие такого заболевания в мере, достаточной для ослабления, прекращения или задержки развития любого из симптомов заболевания (биохимического, гистологического и/или поведенческого). Введение терапевтического агента может уменьшать или устранять умеренные нарушения когнитивных функций у пациентов, у которых еще не развилась характерная патология Альцгеймера.

Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, средства введения, участка-мишени, физиологического состояния субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли субъект человеком или животным, других введенных лекарственных средств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозировки лечения подбирали оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

Антитела настоящего изобретения можно получать в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество антитела в качестве активного компонента в фармацевтически приемлемом носителе. Носитель может быть жидким, таким как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно применять 0,4%-й солевой раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Стерилизацию можно проводить с использованием стандартных, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для соответствующих физиологических условий, такие как агенты корректирования pH и буферизирующие агенты, стабилизаторы, загустители, увлажнители и красители и т.п. Концентрация антител настоящего изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее чем приблизительно 0,5%, обычно по меньшей мере около 1%, и до 15 или 20% вес, и определяется преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, вязкости и т.п., в соответствии с конкретным выбранным способом введения.

Для введения предназначенных для терапевтического применения антител изобретения можно применять любой подходящий путь введения, который обеспечивает доставку агента в организм-хозяина. Например, композиции, описанные в настоящем документе, могут быть составлены с обеспечением их приемлемости для парентерального введения, например интрадермального, внутримышечного, внутривенного, подкожного, интраназального или интракраниального, или их можно вводить в спинномозговую жидкость головного или спинного мозга.

Введение можно осуществлять по схеме с единственной дозой или по схеме со множеством доз, при которой основной курс лечения может включать 1-10 отдельных доз, после чего следуют другие дозы, вводимые в последующие временные интервалы, необходимые для поддержания и/или усиления ответа, например, вторая доза через 1-4 месяца и, если необходимо, последующая(ие) доза(ы) через несколько месяцев. К примерам приемлемых схем лечения относятся: (i) 0, 1 месяц и 6 месяцев, (ii) 0, 7 дней и 1 месяц, (iii) 0 и 1 месяц, (iv) 0 и 6 месяцев, или другие схемы, индуцирующие получение желаемых ответов, благодаря которым предположительно уменьшатся симптомы или тяжесть заболевания.

Антитела настоящего изобретения могут быть лиофилизированы для хранения и перед применением восстановлены в приемлемом носителе. Было показано, что этот способ эффективен для антител и других белковых препаратов, при этом могут быть применены известные специалистам способы лиофилизации и восстановления.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиция, используемая для лечения таупатии, можно использовать в комбинации с другими агентами, которые эффективны для лечения свя-



занных нейродегенеративных заболеваний. В случае БА антитела настоящего изобретения можно вводить в комбинации с агентами, которые уменьшают или предотвращают отложение бета-амилоида (Abeta). Возможно, патологии РНФ-тау и Abeta являются синергетическими. Таким образом, комбинированная терапия, нацеленная на удаление патологий РНФ-тау и Abeta одновременно, и патологий, связанных с Abeta, в то же время может быть более эффективной, чем нацеливание на каждую из них по отдельности. В случае болезни Паркинсона и родственных нейродегенеративных заболеваний иммунная модуляция для удаления агрегированных форм белка альфа-синуклеина также представляет собой новую терапию. Комбинированная терапия, которая нацелена на удаление белков тау-белка и альфа-синуклеина одновременно, может быть более эффективной, чем нацеливание на каждый белок по отдельности.

В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

#### Диагностические методы и наборы

Моноклональные антитела к РНФ-тау настоящего изобретения можно применять в способах диагностики БА или иных таупатий у субъекта.

Таким образом, в другом общем аспекте изобретение относится к способам обнаружения присутствия РНФ-тау у субъекта и способам диагностирования таупатий у субъекта путем обнаружения присутствия РНФ-тау у субъекта с применением моноклонального антител настоящего изобретения или его антигенсвязывающего фрагмента.

Фосфорилированный тау-белок может быть определен во взятой у субъекта биологической пробе (например, пробе крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости) путем приведения биологической пробы в контакт с диагностическим реагентом на основе антител и обнаружения связывания диагностического реагента на основе антител с фосфорилированным тау-белком во взятой у субъекта пробе. Анализ для проведения такого обнаружения включает в себя хорошо известные способы, такие как твердофазный ИФА, иммуногистохимию, вестерн-блоттинг или визуализацию *in vivo*.

Диагностические антитела или аналогичные реагенты могут быть введены путем внутривенной инъекции в тело пациента или напрямую в головной мозг соответствующим путем, который обеспечивает доставку агента в организм-хозяина. Дозировки антител должны находиться в тех же диапазонах, как и для способов лечения. Как правило, антитела метят, хотя в некоторых способах первичное антитело с аффинностью к фосфорилированному тау-белку остается немеченым, но применяют вторичный метящий агент для связывания с первичным антителом. Выбор метки зависит от способа обнаружения. Например, флуоресцентная метка пригодна для оптического обнаружения. Применение парамагнитных меток пригодно для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки могут быть также определены с применением ПЭТ или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT).

Диагностирование выполняют путем сравнения количества, размера и/или интенсивности меченых РНФ-тау, агрегатов тау-белка и/или нейрофибриллярных клубков во взятой у субъекта пробе или у субъекта с соответствующими базовыми значениями. Исходные значения могут представлять собой средние уровни в популяции здоровых людей. Исходные значения могут также представлять собой предшествующие уровни значений, определенные у того же субъекта.

Описанные выше диагностические способы можно также применять для контроля ответа субъекта на лечение путем обнаружения присутствия фосфорилированного тау у субъекта до, в ходе или после лечения. Уменьшение значений по сравнению с базовыми значениями указывает на положительный ответ на лечение. В биологических жидкостях значения могут также временно возрасти при выводе патологического тау-белка из мозга.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на создание набора для выполнения описанных выше методов диагностики и контроля. Как правило, такие наборы содержат диагностический реагент, такой как антитела изобретения, и необязательно детектируемую метку. Диагностическое антитело может само содержать детектируемую метку (например, флуоресцентную молекулу, биотин и т.д.), которая определяется напрямую или с помощью вторичной реакции (например, реакции со стрептавидином). В альтернативном варианте осуществления можно использовать второй реагент, содержащий обнаруживаемую метку, причем второй реагент имеет специфичность связывания с первичным антителом. В диагностическом наборе, приемлемом для измерения уровня РНФ-тау в биологической пробе, антитела набора могут поставляться предварительно связанными с твердой фазой, например с лунками микротитрационного планшета.

Содержание всех указанных ссылок (в том числе ссылок на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и одновременно находящиеся на рассмотрении патентные заявки), упомянутых в настоящей заявке, явным образом полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

#### Варианты осуществления

В изобретении также предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.



- h) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;
- i) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;
- j) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;
- к) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;
- l) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20;
- m) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22;
- n) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26;
- o) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 27, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28;
- p) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 32; или
- q) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления 4 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-3.

Вариант осуществления 5 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 4.

Вариант осуществления 6 представляет собой клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 5.

Вариант осуществления 7 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-3 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 8 представляет собой способ снижения патологической агрегации таубелка или распространения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 7.

Вариант осуществления 9 представляет собой способ лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 7.

Вариант осуществления 10 представляет собой способ по варианту осуществления 9, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного агента для лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта.

Вариант осуществления 11 представляет собой способ лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 7, причем таупатия выбрана из группы, состоящей из семейной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего супрануклеарного пареза зрения, кортикобазальной дегенерации, синдрома Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции, характеризующейся появлением аргирофильных зерен, комплекса амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдрома Дауна, синдрома Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, синдрома Галлервордена - Шпатца, миозита с тельцами включения, болезни Крейтцфельда - Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна - Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (деменции боксеров).

Вариант осуществления 12 представляет собой способ по варианту осуществления 11, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного агента для лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта.

Вариант осуществления 13 представляет собой способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-3, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, подходящих для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры.

Вариант осуществления 14 представляет собой способ получения фармацевтической композиции,

содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-3, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Вариант осуществления 15 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-3 для применения при лечении таупатии у нуждающегося в этом субъекта.

Вариант осуществления 16 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-3 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 7 для применения при лечении таупатии, такой как семейная болезнь Альцгеймера, спорадическая болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий супрануклеарный пареза зрения, кортикобазальная дегенерация, синдром Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменция, характеризующаяся появлением аргирофильных зерен, комплекс амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдром Дауна, синдром Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, синдром Галлервордена - Шпатца, миозит с тельцами включения, болезнь Крейтцфельда - Якоба, множественная системная атрофия, болезнь Ниманна - Пика типа С, церебральная амилоидная ангиопатия с прионными белками, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническая дистрофия, негуамская болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм, хроническая травматическая энцефалопатия и *dementia pugilistica* (деменция боксеров).

Вариант осуществления 17 представляет собой применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-3 для получения лекарственного средства при лечении таупатии у нуждающегося в этом субъекта.

Вариант осуществления 18 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-3 для получения лекарственного средства для лечения таупатии, такой как семейная болезнь Альцгеймера, спорадическая болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий супрануклеарный пареза зрения, кортикобазальная дегенерация, синдром Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменция, характеризующаяся появлением аргирофильных зерен, комплекс амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдром Дауна, синдром Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, синдром Галлервордена - Шпатца, миозит с тельцами включения, болезнь Крейтцфельда - Якоба, множественная системная атрофия, болезнь Ниманна - Пика типа С, церебральная амилоидная ангиопатия с прионными белками, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническая дистрофия, негуамская болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм, хроническая травматическая энцефалопатия и *dementia pugilistica* (деменция боксеров).

Вариант осуществления 19 представляет собой способ обнаружения присутствия РНФ-тау во взятой у субъекта биологической пробе, включающий приведение биологической пробы в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1-3 и обнаружение связывания моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с РНФ-тау во взятой у субъекта пробе.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ по варианту осуществления 19, в котором биологическая проба представляет собой пробу крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости.

Вариант осуществления 21 представляет собой способ обнаружения таупатии у субъекта путем обнаружения присутствия РНФ-тау во взятой у субъекта биологической пробе, включающий приведение биологической пробы в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1-3 и обнаружение связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с РНФ-тау во взятой у субъекта пробе.

### Примеры

Для дополнительной иллюстрации характера изобретения предложены следующие примеры изобретения. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают изобретение и что объем изобретения определен прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

Пример 1. Общие сведения о процессе гуманизации и оценка свойств связывания.

Гуманизация антитела к тау-белку РТЗ.

Исходное антитело РТЗ гуманизировали (см., например, WO 2013/3096380; патент США № 10,000,559B2). Чтобы найти наилучшую комбинацию гуманизированных тяжелых и легких цепей, для гуманизации антител выбирали наиболее выровненные каркасы тяжелой цепи эмбриональной линии человека и легкой цепи эмбриональной линии человека. Человеческий J-сегмент для VL выбирали путем сравнения исходной последовательности J-сегментов с человеческими последовательностями J-сегментов для максимального повышения идентичности последовательностей. Человеческий J-сегмент

для VH включал мутацию G105V. Выбор гуманизированных вариантов посредством SPR в Fab, продуцируемых E.coli.

Способ.

Эксперименты по анализу константы диссоциации, определенной на основе SPR, у гуманизированных супернатантов Fab, полученных из E.coli, проводили с использованием прибора MASS-2. Вкратце, сенсорный чип с амином большой емкости (HCA) активировали с использованием смеси EDC/NHS, при этом поверхность была покрыта нейтравидином ( $> 4000$  RU) с использованием химической реакции аминного сочетания и деактивировали поверхность с использованием этаноламина. После этого биотинилированный фосфо-тау пептид (NPT-6) захватывали посредством нейтравидина на разных уровнях (40-100 RU). Для измерения связывания Fab с захваченным фосфо-тау пептидом неочищенные супернатанты Fab наносили как очищенные растворы на поверхность пептида, и отслеживали профили ассоциации/диссоциации. После диссоциации поверхность регенерировали с помощью фосфорной кислоты для следующего цикла взаимодействий Fab. Сенсограммы для связывания Fab с фосфопептидом анализировали с использованием способа анализа константы диссоциации для определения рангового порядка на основании значений константы диссоциации. Несколько супернатантов Fab сохраняли аналогичные или более высокие константы диссоциации по сравнению с исходным антителом мыши, и их выбирали для конверсии IgG. Сенсограммы связывания панели Fab показаны на фиг. 2A-2AI, а константы диссоциации приведены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты константы диссоциации, определенные на основе SPR с использованием MASS-2, для супернатантов Fab, полученных из E.coli, связывающихся с пептидом NPT-6

Супернатанты Fab	Kd [1/c]**
Очищенный Fab PT3(PT1B187.002)	2,73E-05
Химерный FАВ мыши	< 2,85E-05
L1-P1-D3	< 2,85E-05
L4-P1-A4	< 2,85E-05
L3-P2-A11	< 2,85E-05
L2-P2-A3	< 2,85E-05
L2-P1-B3	< 2,85E-05
L4-P1-B9	< 2,85E-05
H1-P4-E8	< 2,85E-05
H1-E10	3,11E-05
H2-P1-B8	3,37E-05
H1-P2-G11	3,41E-05
H2-B3	3,49E-05
H2-P1-F5	3,50E-05
H1-P4-E11	4,05E-05
H2-P3-C10	1,50E-04
H2-P2-A2	1,65E-04
Прививка FАВ	1,76E-04
H1-P2-G6	1,83E-04
H2-P1-D6	1,89E-04
H2-P3-E1	2,08E-04
H1-P1-G8	2,36E-04
H2-P1-A8	2,40E-04
H2-P4-D7	2,60E-04
H2-P3-C4	2,82E-04
H1-D4	3,02E-04
H1-P3-A4	3,27E-04
H2-P2-F4	3,28E-04
H2-P4-A5	3,90E-04
H1-P3-B9	1,59E-03
H1-P3-C3	2,83E-03

Библиотеки обратных мутаций создавали с помощью методов молекулярной биологии, и библиотеки клонов тестировали на связывание с bt-пептидом посредством твердофазного ИФА с сигналами, сравниваемыми с полностью мышшиной исходной молекулой. Для секвенирования отбирали сигналы, демонстрирующие связывание с более 80% молекулы мышшиного исходного антитела. Были проанализированы последовательности. Выбрали 21 адаптированную для человека тяжелую цепь и 5 адаптированных для человека легких цепей. Кроме того, проводили скрининг, включая кривые полного связывания твердофазного ИФА и анализ константы диссоциации на основе определения SPR выбранных клонов (фиг. 2A-2AI). На основании этих результатов были выбраны 5 тяжелых цепей и 3 легких цепи. Также в твердофазном ИФА протестировали как Fab полную матрицу тяжелой цепи и легкой цепи и подтвердили пре-

дыдущие результаты и выводы. Эти конечные 5 тяжелых и 3 легкие цепи объединяли с получением 15 матричных клонов (табл. 2 и 3) и экспрессировали в виде моноклональных молекул IgG1 и дополнительно тестировали в качестве очищенных mAb для связывания антигена с различными анализами конструирования (Tm/Tagg, CIC, SEC, AC-SINS, оценки аффинности и in-silico EpiVax). На основании этих данных антитело PT1B844 демонстрировало сопоставимые или улучшенные связывающие и биофизические свойства bt-пептида для исходного антитела мыши и было выбрано для дальнейшего конструирования. Также была создана версия PT1B916 IgG1 YTE (табл. 2 и 3).

Как PT1B844, так и PT1B916 содержали потенциально нежелательную (нечеловеческую) точечную мутацию G105V J-сегмента. Для решения этой потенциальной проблемы были созданы mAb для преобразования этого положения обратно в человеческое. Новые клоны экспрессировали YTE как IgG1, так и IgG1 типов для дальнейшего определения характеристик.

Таблица 2

Последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) гуманизированных моноклональных антител

Компонент mAb	Последовательность	SEQ ID NO:
PT3 HC	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQNPEKRLEWVASISKGGNTYY PNSVKGRFTISRDNARNILYLQMSLRSEDALYYCARGWGDYGWFAFWGQVTLVTVS A	1
PT3 LC	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINRYLNWFQQKPGKSPKTLIYRANRL DGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLDYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGDGTKLELK	2
Прививка HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSAAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISK GGNTYYADSVKGRFTISRDNANSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGW FAYWGQVTLVTVSS	3
Прививка LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYLNWFQQKPGKAPKSLIYRANRL DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKEIK	4
PT1B841 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSAAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISK GGNTYYADSVKGRFTISRDNANSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGW FAYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	5

PT1B841 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKSLIYRANRLL DGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	6
PT1B842 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISK GGNTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGWGDYGWF AYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC MHEALHNHYTQKSLSPGK	7
PT1B842 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKSLIYRANRLL SGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDMATYYCQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTV AAPSVMFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV EQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	8
PT1B843 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISK GGNTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGWGDYGWF AYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC MHEALHNHYTQKSLSPGK	9
PT1B843 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKSPKTLIYRANRLL SGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	10
PT1B844 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISK GGNTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGWGDYGWF AYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC MHEALHNHYTQKSLSPGK	11
PT1B844 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKTLIYRANRLL DGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	12
PT1B845 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISK GGNTYYPNVSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGWGDYGWF AYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC MHEALHNHYTQKSLSPGK	13
PT1B845 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKSLIYRANRLL SGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDMATYYCQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTV AAPSVMFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV EQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	14

PT1B846 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISK GGNTYYPNQSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGWGDYGWF AYWGQVTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSKVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	15
PT1B846 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQOKPGKSPKTLIYRANRLL SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYDEFPLTFGQGT KLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	16
PT1B847 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISK GGNTYYPNQSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGWGDYGWF AYWGQVTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSKVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	17
PT1B847 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQOKPGKAPKTLIYRANRLL DGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYDEFPLTFGQGT KLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	18
PT1B848 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISK GGNTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGWGDYGWF AYWGQVTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSKVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	19
PT1B848 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQOKPGKAPKSLIYRANRLL SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLPEDMATYYCQQYDEFPLTFGQGT KLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	20
PT1B849 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISK GGNTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGWGDYGWF AYWGQVTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSKVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	21
PT1B849 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQOKPGKSPKTLIYRANRLL SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYDEFPLTFGQGT KLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	22



PT1B850 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISK GGNTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGWF AYWGQVTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	23
PT1B850 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKTLIYRANRL DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	24
PT1B851 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISK GGNTYYPNSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGWF AYWGQVTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	25
PT1B851 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKSLIYRANRL SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDMATYYCQQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	26
PT1B852 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISK GGNTYYPNSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGWF AYWGQVTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
PT1B852 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYLNWFQKPGKSPKTLIYRANRL SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	28
PT1B853 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISK GGNTYYPNSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGWF A YWGQVTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH E DP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	29
PT1B853 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKTLIYRANRL DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	30

PT1B854 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQNPQKGLWEVVASISK GGNTYYPDSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYDWF AYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKLSLSPGK	31
PT1B854 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKSLIYRANRL SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDMATYYCQYDEFPLTFGQGTKEIKRTV AAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV EQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	32
PT1B855 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQNPQKGLWEVVASISK GGNTYYPDSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYDWF AYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKLSLSPGK	33
PT1B855 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKSPKTLIYRANRL SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYDEFPLTFGQGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	34
PT1B856 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQNPQKGLWEVVASISK GGNTYYPDSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYDWF AYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKLSLSPGK	35
PT1B856 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKTLIYRANRL DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYDEFPLTFGQGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
PT1B916 HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLWEVVASISK GGNTYYPDSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYDWF AYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKLSLSPGK	37
PT1B916 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKTLIYRANRL DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYDEFPLTFGQGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	38

Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно)  
гуманизированных моноклональных антител

Компонент mAb	Последовательность	SEQ ID NO:
PT1B841 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISKGGNTYYA DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	39
PT1B841 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGAPKSLIYRANRLLDGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLOYDEFPLTFGQGTKLEIK	40
PT1B842 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISKGGNTYYP DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	41
PT1B842 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGAPKSLIYRANRLDSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDMATYYCQOYDEFPLTFGQGTKLEIK	42
PT1B843 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISKGGNTYYP DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	43
PT1B843 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGSPKTLIYRANRLDSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYDEFPLTFGQGTKLEIK	44
PT1B844 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISKGGNTYYP DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	45
PT1B844 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGAPKTLIYRANRLLDGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYDEFPLTFGQGTKLEIK	46
PT1B845 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISKGGNTYYP NSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	47
PT1B845 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGAPKSLIYRANRLDSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDMATYYCQOYDEFPLTFGQGTKLEIK	48
PT1B846 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISKGGNTYYP NSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	49
PT1B846 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGSPKTLIYRANRLDSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYDEFPLTFGQGTKLEIK	50
PT1B847 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISKGGNTYYP NSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	51
PT1B847 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGAPKTLIYRANRLLDGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYDEFPLTFGQGTKLEIK	52
PT1B848 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISKGGNTYYP DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	53
PT1B848 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGAPKSLIYRANRLDSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDMATYYCQOYDEFPLTFGQGTKLEIK	54
PT1B849 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISKGGNTYYP DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	55
PT1B849 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGSPKTLIYRANRLDSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYDEFPLTFGQGTKLEIK	56
PT1B850 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISKGGNTYYP DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	57
PT1B850 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGAPKTLIYRANRLLDGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYDEFPLTFGQGTKLEIK	58
PT1B851 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISKGGNTYYP NSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	59
PT1B851 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGAPKSLIYRANRLDSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDMATYYCQOYDEFPLTFGQGTKLEIK	60
PT1B852 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISKGGNTYYP NSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	61
PT1B852 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPKGSPKTLIYRANRLDSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYDEFPLTFGQGTKLEIK	62
PT1B853 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISKGGNTYYP NSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	63

PT1B853 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKTLIYRANRLLDGVPSRF SGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQYDEFPLTFGQGTKLEIK	64
PT1B854 VH	EVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLR <sup>L</sup> SCAASGFTFSSYAMSWVRQNP <sup>G</sup> KGLEWVASISKGGNTYYP DSVKGRFTISRDN <sup>A</sup> KNSLYLQMN <sup>S</sup> LR <sup>A</sup> EDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	65
PT1B854 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKSLIYRANRLLSGVPSRF SGSGSGTDFLTITSSSLQPEDMATYYCQQYDEFPLTFGQGTKLEIK	66
PT1B855 VH	EVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLR <sup>L</sup> SCAASGFTFSSYAMSWVRQNP <sup>G</sup> KGLEWVASISKGGNTYYP DSVKGRFTISRDN <sup>A</sup> KNSLYLQMN <sup>S</sup> LR <sup>A</sup> EDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	67
PT1B855 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKSPKTLIYRANRLSDGVPSRFS GSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQYDEFPLTFGQGTKLEIK	68
PT1B856 VH	EVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLR <sup>L</sup> SCAASGFTFSSYAMSWVRQNP <sup>G</sup> KGLEWVASISKGGNTYYP DSVKGRFTISRDN <sup>A</sup> KNSLYLQMN <sup>S</sup> LR <sup>A</sup> EDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	69
PT1B856 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKTLIYRANRLLDGVPSRF SGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQYDEFPLTFGQGTKLEIK	70
PT1B916 VH	EVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLR <sup>L</sup> SCAASGFTFSSYAMSWVRQAP <sup>G</sup> KGLEWVASISKGGNTYYP DSVKGRFTISRDN <sup>A</sup> KNSLYLQMN <sup>S</sup> LR <sup>A</sup> EDTAVYYCARGWGDYGFAYWGQVTLTVSS	71
PT1B916 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKAPKTLIYRANRLLDGVPSRF SGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQYDEFPLTFGQGTKLEIK	72

Последовательности CDR подчеркнуты

Твердофазный ИФА.

Связывание с синтетическим pT217 + тау-калибрующим пептидом

(PRQEFEV<sup>M</sup>EDHAGTYGL

GDR(dPEG4)GKTKIATPRGAAPP<sup>G</sup>QKG(dPEG4)GSRSR(pT)PSLP(pT)PPTREP<sup>K</sup>KV-амид)

(SEQ ID NO: 81-83, соответственно; полноразмерная последовательность описана как SEQ ID NO: 79)

анализировали с помощью твердофазного ИФА. Фосфопептид (10 нг/мл) непосредственно наносили на планшет и после блокирования 0,1% казеина инкубировали с различными концентрациями указанных антител (PT3, PT1B296 и гуманизированных антител PT1B844, PT1B847, PT1B850 и PT1B856), экспрессированных в виде человеческого IgG1. Обнаружение иммунокомплексов осуществляли путем добавления меченого HRPO антитела козы против F(ab')<sub>2</sub> IgG человека. После промывки проводили обнаружение с использованием одностадийного субстрата TMB (ThermoScientific; Уолтем, штат Массачусетс) в соответствии с инструкциями производителя. Данные связывания на фиг. 3 показали резкое снижение максимального сигнала для антитела PT1B296 по сравнению с PT3. Это не наблюдалось для гуманизированных антител PT1B844, PT1B847, PT1B850 и PT1B856, которые демонстрировали очень похожее связывание по сравнению с PT3.

Оценка связывания с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR/SPR на различных фосфопептидах.

Выбранную панель антител к тау-белку тестировали на связывание с тау-пептидами, фосфорилированными в различных положениях. Эксперименты SPR проводили на приборе Biacore T200. Вкратце, поверхность сенсорного чипа CM5 активировали с использованием смеси 1:1 раствора EDC /NHS. Затем проводили ковалентную иммобилизацию смеси раствора (> 9000 RU) антитела к человеческому и антитела к мышинному Fc-специфичному IgG и проводили деактивацию поверхности сенсорного чипа с помощью этаноламина. Исследуемые антитела и исходное mAb захватывали с помощью анти-Fc поверхности (250-550 RU) и затем выполняли инъекцию серийно разбавленных фосфорилированных тау-пептидов (30 нМ-0,37 нМ за 3 раза). Ассоциацию и диссоциацию контролировали в течение 3 минут и 30 минут соответственно. Сенсограммы для связывания испытуемых mAb с различными фосфорилированными пептидами анализировали с использованием модели Ленгмюра 1 : 1, и результаты представляли в виде констант ассоциации ( $k_{on}$ ), констант диссоциации ( $k_{off}$ ) и аффинностей связывания ( $K_D$ ). Сенсограммы связывания для панели связывания тестового антитела с пептидом NPT-6 представлены на фиг. 4A-4I, а соответствующие кинетика и аффинности - в табл. 4. Аффинности связывания тестируемых антител с полной панелью фосфорилированных тау-пептидов перечислены в табл. 5, а фосфорилированные тау-пептиды представлены в табл. 6. Тестируемые mAb и исходное mAb демонстрируют наибольшую аффинность (диапазон суб-нМ) к пептидам, фосфорилированным в положениях 212 и 217 (NPT-6) и с небольшим пониженным связыванием с дополнительными сайтами фосфорилирования в сочетании с 212 и 217 (NPT-5). Отсутствие фосфорилирования в любом из остатков (212 или 217) приводило к значительной потере связывания (>мкМ; NPT-2, NPT-8, PT25-7, PT25-8) и полная потеря связывания пептидов без фосфорилированных 212 и 217 остатков (PT25-6, NPT-C).

Таблица 4

Результаты определения SPR на приборе Biacore для гуманизованного связывания mAb с пептидом NPT-6 с высокой аффинностью

Образец	Описание	AVG ka (1/Мс)	95% CI ka (1/Мс)	AVG kd (1/с)	95% CI kd (1/с)	AVG KD (нМ)	95% CI KD (нМ)
PT1B17.005	Исходное mAb мыши PT3 mG2a	5,14E+06	(3,95–6,32)E+06	4,23E-04	(2,43–6,03)E-04	81,9	(65,0–98,9)
PT1B296.004	НФА mAb (клиническое mAb)	1,33E+06	(1,10–1,56)E+06	3,33E-04	(2,28–4,39)E-04	253,7	(129,9–377,5)
PT1B234.003	Контрольный PT3	3,29E+06	(1,72–4,86)E+06	1,90E-04	(1,36–2,45)E-04	72,9	(25,8–119,9)
PT1B843.001	Гуманизованное PT3	2,07E+06	(1,53–2,61)E+06	3,68E-04	(2,60–4,76)E-04	180,4	(86,9–273,9)
PT1B844.001	Гуманизованное PT3	1,99E+06	(1,40–2,57)E+06	1,55E-04	(0,558–2,54)E-04	77,2	(48,5–105,9)
PT1B846.001	Гуманизованное PT3	1,33E+06	(1,20–1,47)E+06	3,19E-04	(1,05–5,32)E-04	238,0	(92,4–383,6)
PT1B847.001	Гуманизованное PT3	1,60E+06	(1,35–1,85)E+06	1,15E-04	(0,189–2,11)E-04	73,3	(1,1–145,5)
PT1B850.001	Гуманизованное PT3	1,75E+06	(1,48–2,01)E+06	1,27E-04	(0,432–2,10)E-04	73,2	(17,5–128,9)
PT1B853.001	Гуманизованное PT3	1,32E+06	(0,979–1,65)E+06	2,23E-04	(0,827–3,63)E-04	173,3	(26,7–319,9)
PT1B856.001	Гуманизованное PT3	1,64E+06	(1,47–1,81)E+06	1,85E-04	(0,829–2,87)E-04	113,6	(43,0–184,2)

Таблица 5

Результаты определения SPR на приборе Biacore для гуманизованного связывания mAb с фосфорилированными тау-пептидами

Образец	Фосфопептиды К <sub>p</sub> (нМ)							NPT-C
	NPT-6	NPT-2	NPT-5	NPT-8	PT25-7	PT25-8	PT25-6	
PT1B234.003	92	16 933	236	12 100	8793	7860	Низкое/отсутствующее связывание	Низкое/отсутствующее связывание
PT1B844.001	89	15 011	140	8356	11 411	6911	Низкое/отсутствующее связывание	Низкое/отсутствующее связывание
PT1B847.001	73	21 567	277	18 167	13 233	11 233	Низкое/отсутствующее связывание	Низкое/отсутствующее связывание
PT1B850.001	73	20 900	315	15 367	16 000	10 047	Низкое/отсутствующее связывание	Низкое/отсутствующее связывание
PT1B856.001	114	19 900	250	12 867	10 297	8497	Низкое/отсутствующее связывание	Низкое/отсутствующее связывание
PT1B296.004	354	58 333	429	48 500	39 067	53 633	Низкое/отсутствующее связывание	Низкое/отсутствующее связывание
PT1B333.005	337	33 967	414	21 300	29 067	26 933	Низкое/отсутствующее связывание	Низкое/отсутствующее связывание

Таблица 6

## Пептидные последовательности

Пептид	204						210		212		214			217		220				225		
NPT-6	G	T	P	G	S	R	S	R	T*	P	S	L	P	T*	P	P	T	R	E	P	K	K
NPT-2	G	T	P	G	S	R	S	R	T*	P	S	L	P	T	P	P	T	R	E	P	K	K
NPT-5	G	T	P	G	S	R	S	R	T*	P	S*	L	P	T*	P	P	T	R	E	P	K	K
NPT-8	G	T	P	G	S	R	S	R	T*	P	S*	L	P	T	P	P	T	R	E	P	K	K
PT25-7	G	T	P	G	S	R	S	R	T	P	S	L	P	T*	P	P	T	R	E	P	K	K
PT25-8	G	T	P	G	S	R	S	R	T	P	S*	L	P	T*	P	P	T	R	E	P	K	K
PT25-6	G	T	P	G	S	R	S	R	T	P	S*	L	P	T	P	P	T	R	E	P	K	K
NPT-C	G	T	P	G	S	R	S	R	T	P	S	L	P	T	P	P	T	R	E	P	K	K

\* фосфорилированный остаток

SPR на PHF (Fab + mAb).

Очищенные Fab выбранной панели тестируемых mAb тестировали на связывание с полученным от пациента материалом PHF-тау для определения их внутренних одновалентных аффинностей. Взаимодействие фрагментов антитела Fab к тау-белку с PHF-тау аффинизировали с помощью ProteOn с использованием биосенсорной поверхности, полученной путем захвата-связывания PHF-тау посредством мышинового mAb HT7 в качестве захватывающего реагента. Вкратце, сенсорный чип GLC активировали с использованием смеси 1 : 1 раствора сульфо-NHS/EDC. mAb HT7 ковалентно иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа с использованием химической реакции аминного сочетания (> 3000 RU) и деактивиро-

вали поверхность с помощью этаноламина. Затем проводили захват-связывание 2-кратно отцентрифугированного РНФ-тау над поверхностью НТ7 (> 200 RU) и инъекцию этаноламина для блокирования любых оставшихся реакционноспособных сложных эфиров. Fab к тау-белкам разбавляли в рабочем буфере (HBS с 0,05% Tween и 3 мМ EDTA) и вводили в раствор (0,02-3 нМ в 5-кратных разведениях). Ассоциацию и диссоциацию контролировали в течение 4 и 60 минут соответственно. Регенерацию поверхности сенсора проводили с использованием 10 мМ Gly pH 2,0. Сенсограммы для взаимодействий Fab-РНФ-тау анализировали с использованием модели связывания Ленгмюра 1 : 1, и результаты представляли в виде констант ассоциации ( $k_{on}$ ), констант диссоциации ( $k_{off}$ ) и аффинностей связывания ( $K_D$ ). Все Fab очень сильно связываются с РНФ-тау с аффинностями в диапазоне низких пМ. Гуманизированные Fab сохраняют аналогичные аффинности в качестве исходного Fab, PT1B187 (фиг. 5A-5F и табл. 7).

Таблица 7

Результаты определения SPR на приборе ProteOn для связывания гуманизированного Fab с РНФ-тау

Fab	Соответствующее mAb	$k_{on} \pm 95\% \text{ C.I.}$ ( $\times 10^6 \text{ 1/Мс}$ )	$k_{off} \pm 95\% \text{ C.I.}$ ( $\times 10^{-5} \text{ 1/с}$ )	$K_D \pm 95\% \text{ C.I.}$ (нМ)
PT1B187 (PT3)	PT3	$5,1 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,6$	$6,6 \pm 1,7$
PT1B324 (B296)	JNJ'657	$3,0 \pm 0,3$	$8,8 \pm 0,2$	$29,7 \pm 3,0$
PT1B877 (B844)	PT1B844	$3,3 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,4$	$9,7 \pm 2,1$
PT1B880 (B847)	PT1B847	$3,8 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,5$	$8,4 \pm 2,0$
PT1B883 (B850)	PT1B850	$3,9 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,5$	$8,5 \pm 1,8$
PT1B889 (B856)	PT1B856	$3,6 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,6$	$9,4 \pm 2,5$

Материалы и способы картирования паратопов HDX-MS.

Эксперимент по обмену данными для HDX-MS. Реакцию обмена инициировали путем смешивания 4 мкл из 25 мкМ Fab тау-белка (PT1B187 или PT1B887) с 30 мкМ NPT-6 и 36 мкл H<sub>2</sub>O или с дейтерированным буфером (20 мМ MES, pH 6,4, 150 мМ NaCl в 95% D<sub>2</sub>O или 20 мМ Трис, pH 8,4, 150 мМ NaCl в 95% D<sub>2</sub>O), или без них. Реакционную смесь инкубировали в течение 15, 50, 150, 500, 1500, 5000 или 15000 с при 3,2°C или 23°C. Ионообменный раствор гасили путем добавления 40 мкл охлажденной 8 М мочевины, 1 М ТСЕР, pH 3,0, и сразу анализировали.

Общая процедура получения данных HDX-MS. Подготовку образцов HDx-MS проводили с помощью автоматизированной системы HDx (LEAP Technologies, г. Морристилл, штат Северная Каролина). Колонки и насосы; протеаза, протеаза типа XIII (протеаза из *Aspergillus saitoi*, тип XIII) /пепсин (мас./мас., 1:1; 2,1×30 мм) (NovaBioAssays Inc., Вобурн, штат Массачусетс); обращенно-фазная предколонка ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (2,1 мм×5 мм) (Waters, Милфорд, штат Массачусетс), аналитическая колонка Accucore C18 (2,1 мм×100 мм) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс); и LC насос, VH-P10-A (Thermo Fisher Scientific). Параметры загрузочного насоса (из колонки с протеазой в предколонку) были установлены следующим образом: скорость потока 600 мкл/мин, 99% воды, 1% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты. Настройки градиентного насоса (от предколонки к аналитической колонке): от 8% до 28% ацетонитрила в 0,1% водной муравьиной кислоте в течение 20 мин при 100 мкл/мин.

Сбор данных MS. Анализы методом масс-спектрометрии проводили с использованием масс-спектрометра LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) с температурой капилляра 275 °C, разрешением 150000 и диапазоном масс (m/z) 300-2000.

Извлечение данных HDX-MS. Приложение BioPharmma Finder 3.0 (Thermo Fisher Scientific) использовали для идентификации пептидов нейтральных образцов перед проведением экспериментов HDX. Для экстракции центроидных значений из MS файлов необработанных данных для проведения экспериментов HDX использовали программу HDExaminer версии 2.1 (Sierra Analytics, г. Модесто, штат Калифорния).

Результаты.

Сегменты 30-32, 32-33 (CDR1), 100-101, 102, 103-105, 107 (CDR3) тяжелой цепи PT1B187 (соответствующее mAb представляет собой PT3) подвергались очень сильному возмущению при связывании с NPT-6, что указывает на то, что они являются важными составляющими паратопа. Сегмент 93-96 (CDR3) легкой цепи также подвергался значительному возмущению и вовлечен в паратоп. Сегмент 50-53 (CDR2) легкой цепи, вероятно, был вовлечен в паратоп. Несмотря на то, что среднее изменение в сегменте 50-53 было небольшим, если бы мониторинг осуществлялся в течение более длительных интервалов времени, было бы очевидно значительное возмущение на основании кривых накопления дейтерия, которые этот сегмент стал бы демонстрировать. CDR2 тяжелой цепи и CDR1 легкой цепи, вероятно, не был вовлечен в паратоп. Некоторые части тяжелой цепи, сегменты 20-23, 44-45, 69, 72-73, 75-77 и 78, показали значительное изменение уровней дейтерирования при связывании с NPT-6, предположительно из-за аллостерических влияний.

Сегменты 30-31, 32 (CDR1), 53-54 (CDR2) 97-98, 99, 100-101, 102, 103-104 и 105 (CDR3) тяжелой цепи PT1B877 (соответствующее mAb представляет собой PT1B844) подвергались очень сильному возмущению при связывании с NPT-6, что указывает на то, что все три CDR в тяжелой цепи были важными составляющими паратопа. CDR2 легкой цепи может участвовать в связывании. Несмотря на то, что

среднее изменение в сегменте 50-55 было чуть ниже порога 10%, если бы мониторинг осуществлялся в течение более длительных интервалов времени, было бы очевидно значительное возмущение на основании кривых накопления дейтерия, которые этот сегмент стал бы демонстрировать. CDR1 (остатки 27-32) легкой цепи, вероятно, не был вовлечен в паратоп. CDR3 легкой цепи не отследили посредством HDX-MS. Некоторые части тяжелой цепи, сегменты 22, 44-45, 69, 70-71 и 74-78, показали значительное изменение уровней дейтерирования при связывании с NPT-6, предположительно из-за аллостерических влияний.

Пример 2. Оценка реактивности с агрегированным и неагрегированным тау-белком.

Перекрестная реактивность белков разных биологических видов, определенная с помощью вестерн-блоттинга.

Дальнейшее профилирование антител проводили путем оценки связывания с тау-белком в образцах головного мозга разных биологических видов (мыши, крысы, собаки, минисвиньи, мартышки, яванского макака и человека). Для человеческого тау-белка было проведено различие между растворимым тау-белком (термостабильный экстракт из головного мозга человека без БА) и агрегированным PHF-тау (нерастворимый в саркозиле, полученный из головного мозга человека с БА (Braak VI)). Для того чтобы определить более низкое аффинное взаимодействие с белками, не связанным с тау-белком, антитела тестировали в концентрации 1 мкг/мл. Относительно высокие количества гомогенатов головного мозга (20 мкг общего белка) загружали на гель (4-12% гели Bis-Tris Precast (BioRad; Геркулес, штат Калифорния, США) и проводили прогон в буфере MOPS (3-морфолинопропан-1-сульфоновая кислота). После прогона белки переносили в нитроцеллюлозную мембрану путем сухого блоттинга с использованием системы Turboblot (BioRad). После переноса мембраны блокировали с использованием 5% обезжиренного сухого молока, растворенного в трис-солевом буферном растворе с Tween (TBS-T), в течение по меньшей мере 1 ч и инкубировали в течение ночи (4°C) в присутствии антител PT3, PT1B296 и гуманизированных антител PT1B844, PT1B847, PT1B850 и PT1B856 (все при 1 мкг/мл) или в течение 1 ч с меченым HRPO PT9 (Vandermeeren et al., J. Alzheimers Dis. 65(1):265-281 (2018)). После промывки (3x5 минут в TBS-T) первичные антитела были обнаружены с помощью меченого HRPO антитела козы против IgG человека (Jackson Immunoresearch; Вест-Гроув, штат Пенсильвания, США) в течение 1 ч. После последнего этапа промывки (4x5 минут в TBS-T) обнаружение проводили с использованием ECL West Dura (Thermo Scientific), а изображения сканировали. Обзор этих профилей показан на фиг. 6А-6Н, и четко отмечена реактивность всех вариантов PT3 с тау-белком из головного мозга мыши, крысы, собаки, минисвиньи и мартышки.

Связывание с тау в человеческом HSE было очень незначительным по сравнению с сильной реактивностью, связанной с PHF из головного мозга больных БА. Как и ожидалось, ни одно из антител не реагировало с экстрактом головного мозга тау-КО-мышей. Кроме того, ни одно из антител не достигло уровня для тау-белка яванского макака, в котором треонин в положении 220 мутировал в аланин. В целом данные подтвердили, что процесс гуманизации не изменяет реактивность в отношении тау-белка разных биологических видов.

Профилирование антител с использованием ИНС.

Иммуногистохимический анализ проводили на криосрезах головного мозга больного БА и субъекта без БА для подтверждения реактивности с физиологическим и патофизиологическим тау-белками *in situ*. Криоконсервированную ткань головного мозга человека нарезали с помощью криостата (толщина 20 мкм) и перед использованием хранили при -80°C. Срезы сушили с последующей фиксацией формалином, блокированием эндогенной пероксидазы 3% пероксидом водорода (DAKO, г. Глоstrup, Дания, S2023) и пермеабиллизацией в PBS1x + 0,3% Triton X-100 в течение 1 ч. Первичные антитела (0,4 мкг/мл) разбавляли в разбавителе для антител с компонентами снижения фоновой окраски (DAKO, S3022) и наносили на срезы на 1 час. После интенсивной промывки микропрепараты инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена антимышиным вторичным антителом (Envision, DAKO, K4000) с последующим мечением хромогенным DAB (DAKO, K4368). Микропрепараты подвергали контрастированию гематоксилином, дегидратировали и заключали в органическую среду для заливки (Vectamount, Vector labs, Burlingame, CA, USA, H-5000). Визуализацию проводили с помощью прибора Hamamatsu NanoZoomer 2.0 rs (Hamamatsu Photonics, Шизуока, Япония). PT3, PT1B296 и гуманизированное антитело PT1B844 демонстрировало аналогичное (сильное) связывание с агрегированным тау-белком из головного мозга больного БА и только незначительную реакционную способность в отношении аналогичного среза, полученного из головного мозга от субъекта без БА (фиг. 7А-7С), что согласуется с данными вестерн-блоттинга (фиг. 6А-6Н).

Пример 3. Функциональное тестирование в клеточных анализах.

PT3, PT1B296 и гуманизированные антитела PT1B844, PT1B847, PT1B850 и PT1B856 тестировали на ингибирование агрегирования тау-белка в анализе иммунодеплеции. В анализе используются клетки НЕК, экспрессирующие два фрагмента K18 тау-белка с метками хромофора, которые генерируют сигнал, оказавшись непосредственной близости при агрегации. Когда клетки обрабатывали агрегатами агрегированных и фосфорилированных полноразмерных тау-белков, полученными из разных источников, индуцировалась агрегация K18, которую количественно оценивали путем подсчета клеток, положительных к переносу энергии резонанса флуоресценции (FRET), с использованием сортировки клеток с активиро-

ванной флуоресценцией (FACS) (Holmes et al., 2014, PNAS. 111(41):E4376-85).

Клеточный анализ методом иммунодеплеции.

Чтобы исследовать, относится ли значение ингибирования максимального процентного содержания к плотности эпитопов на агрегатах или к количеству агрегатов, содержащих эпитоп для РТЗ, РТ1В296, и гуманизированным антителам РТ1В844, РТ1В847, РТ1В850 и РТ1В856, проводили анализы иммунодеплеции. В анализе методом иммунодеплеции агрегатов тау-белка инкубировали с тестовым антителом и удаляли их из раствора гранулами с белком G. Супернатант после деплеции проверяли на остаточную способность к агрегированию в содержащих хромофор-K18 клетках НЕК и анализировали методом FACS, как описано ранее (Holmes et al., Proc Natl Acad Sci USA. 111(41):E4376-85, 2014).

Гомогенаты, содержащие агрегаты тау-белка для иммунодеплеции, получали из криоконсервированной ткани головного мозга человека, больного БА. В анализе иммунодеплеции с применением тканей мозга человека с БА супернатант после деплеции проверяли в присутствии трансфекционного реагента Липофектамин2000 для получения приемлемого аналитического окна. Агрегирование тау-белка можно полностью убрать с помощью РТЗ, РТ1В296 и гуманизированных антител РТ1В844, РТ1В847, РТ1В850 и РТ1В856 (фиг. 8А и 8В) в общих гомогенатах из головного мозга человека, больного БА. В результате сложного разведения общего гомогената (который содержит как мономерный (неагрегированных) тау-белок, так и агрегирующиеся фибриллы тау-белка), различия в аффинности антител не обнаруживают в данном типе анализа.

Механизм действия терапии антителами к тау-белку по-прежнему является предметом обсуждения, и было предложено множество механизмов. Опосредованное антителом удаление внеклеточных агрегатов микроглиальными клетками недавно было предложено в качестве одного доминантного механизма действия (Funk et al., J Biol Chem. 290(35):21652-62, 2015 и McEwan et al., 2017, PNAS 114:574-9). С учетом того, что иммунодеплеция агрегированного материала, полученного из человеческого мозга, может считаться наиболее предполагаемым клеточным результатом, согласующимся с высокой максимальной эффективностью гуманизированных антител, которая была аналогична эффективности РТЗ, предполагают, что современные гуманизированные молекулы РТ1В844, РТ1В847, РТ1В850 и РТ1В856 являются перспективными терапевтическими кандидатами.

Пример 4. Эффективность *in vivo* в модели с инъекциями РНФ.

Была создана трансгенная модель с инъекциями мыши Р301L, в которой вызывающий агрегирование фрагмент тау-белка, такой как синтетические фибриллы K18 (Li and Lee, Biochemistry. 45(51):15692-701, 2006) или агрегаты РН-тау, полученные из тканей мозга человека с БА, вводили в область коры головного мозга или гиппокампа модели трансгенной мыши Р301L в возрасте, когда автономная от клеток агрегация еще не началось. Модель с инъекциями предназначалась для имитации критического компонента внеклеточной агрегации при распространении тау-патологии. Введенные фибриллы K18 или агрегаты тау-белка индуцировали таупатию на участке инъекции и, в меньшей степени, в связанной контр-латеральной области (Peeraer et al., Neurobiol Dis. 73:83-95, 2015). Модель позволяла проверять потенциал антител к подавлению агрегирования, таких как антитела к тау-белку настоящего изобретения, при совместной инъекции с полученными из тканей мозга человека с БА агрегатами РН-тау или фибриллами K18 (Iba et al., 2015, J Neurosci. 33(3): 1024-37, 2013; Iba et al., Acta Neuropathol. 130(3):349-62).

Кортикальная инъекция нерастворимой в саркозиле фракции полученной после вскрытия ткани пациента с БА вызывала медленно прогрессирующее возрастание агрегации тау-белка. В инъектированном полушарии первые измеримые сигналы появлялись через 1 месяц после инъекции и прогрессировали далее через 3 месяца после инъекции. Через пять месяцев после инъекции у некоторых животных началось образование клубков, вызываемое мутацией Р301L (Terwel et al., J Biol Chem. 280(5):3963-73, 2005). Уровни окрашивания АТ8 увеличивались в период от 1 до 3 месяцев (публикация патента США № 2018/0265575), поэтому эксперименты по эффективности антител анализировали через 2 месяца после совместной инъекции (Vandermeeren et al., J. Alzheimers Dis. 65(1): 265-81 (2018)). Кроме того, гиппокампальная инъекция нерастворимой в саркозиле фракции полученной после вскрытия ткани пациента с БА вызывала дозозависимое возрастание агрегации тау-белка по результатам анализа на платформе MesoScale Discoveries (MSD; Meso Scale Discover; Роквилл, штат Мэриленд, США) нерастворимых в саркозиле фракций из инъектированных полушарий.

Лечение животных и интракраниальная инъекция.

Для инъекционных исследований применяли трансгенных мышей тау-Р301L, у которых экспрессировалась самая длинная изоформа человеческого тау-белка с мутацией Р301L (Тау-4R/2N-Р301L) (Terwel et al., 2005, Id.), для проведения хирургии в возрасте 3 месяцев. Все эксперименты проводили в соответствии с протоколами, одобренными локальными комитетами по этике. Для стереотактической хирургии мыши получали одностороннюю (правое полушарие) инъекцию в гиппокамп (AP -2,0, ML +2,0 (через темя), DV 1,8 мм (через твердую оболочку)) 3 мкл (скорость 0,25 мкл/мин) нерастворимого в саркозиле препарата из полученной после вскрытия ткани пациента с БА (обогащенный парными спиральными филаментами, eРНФ) при наличии или отсутствии моноклональных антител. Мышей умерщвляли для вскрытия (через 2 месяца после интракраниальной инъекции).



#### Процедура экстракции.

Ткань из инъектированного полушария мыши взвешивали и гомогенизировали в 6 объемах гомогенизационного буфера (10 мМ Трис HCl (pH 7,6); 0,8 мМ NaCl; 10% мас./об. сахарозы; 1 мМ ЭГТК; смесь для ингибирования фосфатазы PhosStop; не содержащие ЭДТК мини ингибиторы протеаз). Гомогенат центрифугировали при 28000×g в течение 20 минут и добавляли 1% N-лаурилсаркозина после отбора аликвоты из полученного супернатанта (полный гомогенат). Через 90 минут (900 об/мин, 37°C) растворы повторно центрифугировали при 184000×g в течение 1 ч. Супернатанты сохраняли как растворимую в саркозиле фракцию, а осадок, содержащий нерастворимый в саркозиле материал, ресуспендировали в гомогенизационном буфере.

#### Биохимический анализ.

Наносимые антитела (PT51) разводили в PBS (1 мкг/мл) и разливали аликвоты в планшеты для анализа MSD (30 мкл на лунку) (L15XA, Mesoscale Discoveries), которые инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. После промывки 5×200 мкл PBS/0,5% Tween-20 планшеты блокировали 0,1% казеина в PBS и еще раз промывали 5×200 мкл PBS/0,5% Tween-20. После добавления проб (нерастворимых в саркозиле фракций) и стандартов (и те и другие растворенные в 0,1% казеина в PBS) планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. Затем планшеты промывали 5×200 мкл PBS/0,5% Tween-20, добавляли конъюгированные с меткой SULFO-TAG™ детекторные антитела (PT51) в 0,1% казеина в PBS и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на 600 об/мин. После последней промывки (5×200 мкл PBS/0,5% Tween-20) добавляли 150 мкл 2 X буфера T и считывали планшеты на визуализаторе платформы MSD. Необработанные сигналы нормировали по стандартной кривой, содержащей 16 разбавлений нерастворимого в саркозиле препарата из полученной после вскрытия ткани пациента с БА (ePHF). Исходные сигналы и стандартную кривую выражали в условных единицах (AU) ePHF. Статистический анализ (дисперсионный анализ (ANOVA) с постпроверкой по критерию Бонферрони) проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и с помощью разработанного в лаборатории приложения для автоматизированного анализа.

#### Результаты.

Несколько внутренних антител к тау-белку и PT3 были оценены в этой модели совместной инъекции (см., например, публикацию патента США № 2018/0265575 и Vandermeeren et al., J. Alzheimers Dis. 65(1):265-81 (2018)). В этом исследовании все молекулы тестировали как химерные варианты mG2a. Из гуманизированных вариантов PT1B844 сравнивали с PT3, PT1B296 и с IPN002 в модели совместных инъекций, где 2 пмоль антитела вводили совместно с 2 пмоль PHF, как описано в Vandermeeren et al., J. Alzheimers Dis. 65(1):265-81 (2018)). Данные на фиг. 9B-9D демонстрируют, что это количество оказывает максимальную эффективность посредством антитела. Для PT3, PT1B296 и PT1B844, эффективность была явно больше по сравнению с эффектом, оказываемым посредством IPN002. В дополнение к этой концентрации для сравнения между PT1B296 и PT1B844 использовали более низкую концентрацию антител (0,06 пмоль).

#### Пример 5. Вовлечение эпитопа ex vivo.

Несмотря на то, что агрегаты патологических тау-белков трудно обнаруживать, различные фрагменты тау-белка были обнаружены в спинномозговой жидкости (СМЖ). Применение технологии сверхчувствительного SIMOA позволило обнаружить эпитоп в СМЖ с использованием PT3, PT1B296 и гуманизированных антител (см., например, публикацию патента США № 2019/0271710). Обработка антител приводила к уменьшению свободных сигналов pT217+ (см., например, Galpern et al., Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association 15(7):252-3 (2019)). Поскольку гуманизированные антитела имеют сходную аффинность по сравнению с PT3 и более высокую аффинность по сравнению с PT1B296, ожидалось, что различия в аффинности были учтены в различных активностях в анализе с добавлением в СМЖ, где увеличение концентрации антител выполнялось "добавлением" в СМЖ после того, как уровни свободного pT217 измеряли с помощью SIMOA, как описано (см., например, публикацию патента США № 2019/0271710).

#### M&M для SIMOA.

Представлены следующие специфические реагенты для анализа: Набор Simoa Homebuca (Quantierx, кат. № 101351; Quanterix; Биллерика, штат Массачусетс, США), вспомогательные гранулы (Quanterix, кат. № 101732), мышинные моноклональные антитела pT3 (mAb), mAb hT43, mAb pT82 и mAb hT7. pT3 представляет собой исходное антитело, которое распознает p217+ тау-белок, а его гуманизированное производное в настоящем документе называется гуманизированным mAb pT3.

Пробы разводили в 50 мМ Tris, 50 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 2%-ом бычьим сывороточным альбумине, 0,1% Tween 20, 0,05% ProClin 300, pH 7,8.

Для калибровки анализа использовали два пептида, специально изготовленных компанией New England Peptide (г. Гарднер, Массачусетс, США) (калибровочные пептиды).

Пептид pT3xhT43 содержит эпитопы hT43, PT51 и pT3, соединенные PEG4 линкерами, и имеет молекулярную массу 6893 г/моль. Аминокислотная последовательность пептида pT3xhT43 представляет собой

PRQEFEVMEHDAGTYGLGDR(dPEG4)GKTKIATPRGAAPPQKG(dPEG4)GSRSR(pT)  
PSLP(pT)PPTREPCKV-амид (SEQ ID NO: 81-83, соответственно; полноразмерная последовательность описана как SEQ ID NO: 79).

Пептид pT3xpT82 содержит эпитопы pT82 и pT3, соединенные PEG4 линкером, и имеет молекулярную массу 4551 г/моль. Аминокислотная последовательность пептида pT3xpT82 представляет собой Ac-SLEDEAAGHVTQARMVSK(dPEG4)GSRSR(pT)PSLP(pT)PPTREPCKV-амид (SEQ ID NO: 84 и 83, соответственно; полноразмерная последовательность описана как SEQ ID NO: 80).

Подготовка реагентов.

Захватывающие гранулы покрывали 0,3 мг/мл иммобилизующего Ab в соответствии с протоколом, представленным в руководстве Quanterix. Захватывающие гранулы с покрытием разводили в буфере разбавителя гранул до 200000 гранул/мл и добавляли 200000 гранул/мл вспомогательных гранул так, чтобы общая концентрация гранул составляла 400000 гранул/мл. Детекторные антитела биотинилировали при 60× в соответствии с протоколом, приведенным в руководстве Quanterix, и разводили в разбавителе для детектора/пробы Homebrew до 1,8 мкг/мл.

Калибровочные пептиды разводили до концентрации 5 мг/мл в 0,1% смеси фосфорной кислоты и воды, разделяли на аликвоты по 20 мкл и замораживали. По готовности к применению аликвоты калибровочных пептидов размораживали и разбавляли в соотношении 1:1000 (например, 1,5 мкл в 1498,5 мкл), и этот раствор разводили 1:1000 таким образом, чтобы конечная концентрация пептидов составляла 5000 пг/мл. Строили стандартную кривую с 3× разведениями, начиная с 30 пг/мл.

Пробы СМЖ разводили по меньшей мере 1 : 4 в разбавителе для проб. Пробы здоровых добровольцев (HV) разводили 1:5 или 1:10, а пробы от больных БА разводили по меньшей мере 1:20.

Анализ Simoa.

Был создан специализированный анализ Simoa, включающий двухстадийный протокол, включающий инкубацию 35 минут с захватывающими Ab, пробой и детекторными Ab, промывку, а затем 5 минут со стрептавидин-β-галактозидазой (SBG). Каждая реакционная смесь содержала 25 мкл раствора гранул, 100 мкл пробы или калибровочных пептидов, 20 мкл детекторного раствора, 100 мкл SBG. Антителам присваивали имена, и за один раз можно было загрузить до пяти захватных антител и пяти детекторных антител. Реакции проводили в кюветах Simoa с помощью прибора, промывали последний раз и загружали в измерительные диски с субстратом β-галактозидазы (RGP), после чего проводили измерения прибором.

Результаты.

Данные на фиг. 10A-10B показали зависимое от концентрации снижение сигнала pT217+ в пуле СМЖ с низкими уровнями pT217+, но также и в пуле, содержащем высокие уровни pT217+, измеренные с помощью SIMOA. В соответствии с данными аффинности пептида наблюдали более сильное ингибирование для pT3 (EC<sub>50</sub> значение 14 нг/мл) и гуманизированных вариантов (включая pT1B844 (значение EC<sub>50</sub> 24 нг/мл)) по сравнению с pT1B296 (значение EC<sub>50</sub> 248 нг/мл).

Пример 6. Улучшенное значение T1/2 в плазме для pT1B916, вариант YTE pT1B844.

Важным параметром для терапевтического потенциала антитела является период полужизни в плазме. Поскольку его можно увеличить путем модификации аффинности FcRn посредством мутаций M252Y/S254T/T256E в Fc-области (Dall'Acqua et al., JBC 281(33):23514-24 (2006)), эта стратегия была применена к молекуле pT1B844 для получения pT1B916, молекулы с идентичной антигенсвязывающей областью, но с мутацией M252Y/S254T/T256E в Fc-области. Чтобы продемонстрировать ее период полужизни в плазме крови, проводили исследование PK однодозовой плазмы крови у яванского макака. После в/в инъекции pT1B844 или pT1B916 (10 мг/кг) образцы плазмы собирали в моменты времени, указанные на фиг. 11, с последним образцом, взятым на 42 день после введения дозы.

Аллотип-селективное обнаружение тАб человеческого IgG1.

Данные на фиг. 11 показали зависимое от времени снижение уровней антител в плазме. Распад pT1B916 (20,05 дней ±) происходил медленнее по сравнению с pT1B844 (6,95 дней ±), что указывает на 2,5-кратное увеличение периода полужизни в плазме для pT1B916.

Хотя изобретение включает подробное описание со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, среднему специалисту в данной области будет очевидно, что в него могут быть внесены различные изменения и модификации, без отступления от сущности и объема изобретения.

## Ссылки.

- Abhinandan and Martin, *Mol Immunol.* 45:3832–9, 2008.
- Adams et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):213-21, 2010
- Allen et al., *J Neurosci.* 22(21):9340-51, 2002
- Almagro, *Mol Recognit.* 17:132-43, 2004
- Asuni et al., *J Neurosci.* 27:9115-29, 2007
- Boutajangout et al., *J Neurochem.* 118:658-67, 2011
- Boutajangout et al., *J Neurosci.* 30:16559-66, 2010
- Brunden et al., *Nat Rev Drug Discov.* 8:783-93, 2009
- Butner and Kirschner, *J Cell Biol.* 115(3):717-30, 1991
- Chai et al., *J Biol Chem.* 286:34457-67, 2011
- Chothia and Lesk, *J Mol Biol.* 196:901-17, 1987
- Clavaguera et al., *Nat Cell Biol.* 11:909-13, 2009
- Clavaguera et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(23):9535-40, 2013
- Clavaguera et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(23):9535-40, 2013
- Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 50(Pt 5):760-3, 1994
- Collin et al., *Brain.* 137(Pt 10):2834-46, 2014
- de Calignon et al., *Neuron.* 73(4):685-97, 2012
- Dall'Acqua et al., *J Biol. Chem.* 281(33); 23514-23524, 2006
- Emsley and Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60(Pt 12 Pt 1):2126-32, 2004
- Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)
- Fishwild et al., *Nat Biotechnol.* 14:845-51, 1996
- Fransson et al., *J Mol Biol.* 398(2):214-31, 2010
- Frost et al., *J Biol Chem.* 284:12845-52, 2009
- Funk et al., *J Biol Chem.* 290(35):21652-62, 2015
- Galpern et al., *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 2019; 15(7) 252-253.
- Goedert et al., *Biochemical J.* 301(Pt3):871-877
- Hanger et al., *Trends Mol Med.* 15:112-9, 2009
- Hoffmann et al., *Biochemistry.* 36(26):8114-24, 1997
- Holmes et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(41):E4376-85, 2014
- Iba et al., *Acta Neuropathol.* 130(3):349-62, 2015

- Iba et al., *J Neurosci.* 33(3):1024-37, 2013
- Julien et al., *Methods Mol Biol.* 849:473-91, 2012
- Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):125-32, 2010
- Knappik et al., *J Mol Biol.* 296:57-86, 2000
- Knight et al., *Platelets.* 15:409-18, 2004
- Kohler and Milstein, *Nature.* 256:495-7, 1975
- Krebs et al., *J Immunol Methods.* 254:67-84, 2001
- Lee et al., *Cell Rep.* 16(6):1690-700, 2016
- Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* 27:55-77, 2003
- Leong et al., *Cytokine.* 16:106-19, 2001
- Li and Lee, *Biochemistry.* 45(51):15692-701, 2006
- Liu et al., *Brain Imaging Behav.* 6(4):610-20, 2012
- Lonberg et al., *Nature.* 368:856-9, 1994
- Malia et al., *Proteins.* 84:427-434, 2016
- Martin and Thornton, *J Mol Biol.* 263(5):800-15, 1996
- Matsuo et al., *Neuron.* 13(4):989-1002, 1994
- McCoy et al., *J Appl Crystallogr.* 40(Pt 4):658-674, 2007
- McEwan et al., 2017, *PNAS* 114(3):574-9
- Mendez et al., *Nat Genet.* 15:146-56, 1997
- Mercken et al., *Acta Neuropathol.* 84(3):265-72, 1992
- Mercken, Ph.D. Thesis: University of Antwerp, Wilrijk-Antwerp, 1991
- Mocanu et al., *J Neurosci.* 28(3):737-48, 2008
- Morris et al., *Nat Neurosci.* 18(8):1183-9, 2015
- Morris et al., *Neuron.* 70:410-26, 2011.
- Murshudov et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 53(Pt 3):240-55, 1997
- Oddo et al., *J Neurochem.* 102(4):1053-63, 2007
- Otvos et al., *J Neurosci Res.* 39(6):669-73, 1994
- Padlan et al., *Mol. Immunol.* 28:489-98, 1991
- Peeraer et al., *Neurobiol Dis.* 73:83-95, 2015
- Queen et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:10029-33, 1989
- Scattoni et al., *Behav Brain Res.* 208(1):250-7, 2010
- Schroeder et al., *J Neuroimmune Pharmacol.* 11(1):9-25, 2016
- Seubert et al., *J Biol Chem.* 270(32):18917-22, 1995
- Shi et al., *J Mol Biol.* 397:385-96, 2010
- Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* 20:685-91, 2009
- Terwel et al., *J Biol Chem.* 280(5):3963-73, 2005
- Vandermeeren et al., *J Alzheimers Dis.* 2018;65(1):265-281
- Wischik et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:4884-8, 1988
- Wu and Kabat, *J Exp Med.* 132:211-50, 1970
- Yang et al., *Protein Eng.* 16:761-70, 2003
- Yoshiyama et al., *Neuron.* 53(3):337-51, 2007
- Zhao et al., *Protein Expr Purif.* 67(2):182-9, 2009

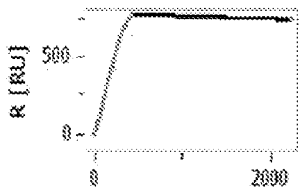


- l) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22;
- m) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26;
- n) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 27, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28;
- o) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 32; или
- p) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34.
3. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2.
4. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.3.
5. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.3 или вектор по п.4.
6. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2 и фармацевтически приемлемый носитель.
7. Способ снижения патологической агрегации тау-белка или распространения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.6.
8. Способ лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.6.
9. Способ по п.8, в котором таупатию выбирают из группы, состоящей из семейной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего супрануклеарного пареза зрения, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна -Штреусслера - Шейнкера, болезни Галлервордена - Шпатца, миозита с тельцами включения, болезни Крейтцфельда - Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна - Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (деменции боксеров).
10. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента любому из пп.1, 2, включающий культивирование клетки-хозяина по п.5 в условиях, подходящих для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры.
11. Способ обнаружения присутствия РНФ-тау во взятой у субъекта биологической пробе, где способ включает приведение биологической пробы в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по п.1 или 2 и обнаружение присутствия РНФ-тау в образце путем обнаружения связывания моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с РНФ-тау.
12. Способ по п.11, в котором биологическая проба представляет собой пробу крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости.



Фиг. 1

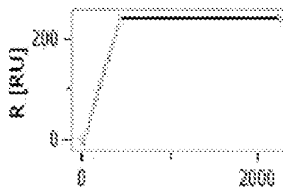
Подгонка графика для Fab PT3 (PT1B187.002)



Время [с]

A

Подгонка графика для химерного FAB



Время [с]

B

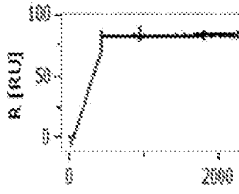
Подгонка графика для L1P1\_D3



Время [с]

C

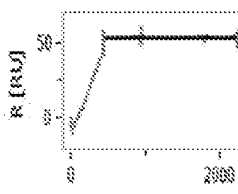
Подгонка графика для L4P1\_A4



Время [с]

D

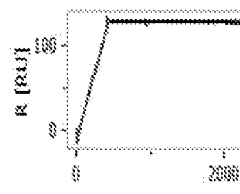
Подгонка графика для L3P2\_A11



Время [с]

E

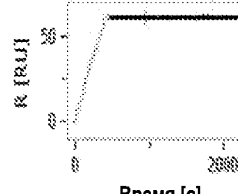
Подгонка графика для L2P2\_A3



Время [с]

F

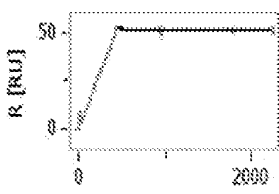
Подгонка графика для L2P1\_B3



Время [с]

G

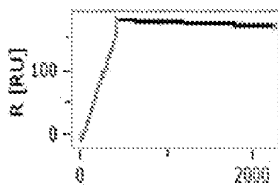
Подгонка графика для L4P1\_B9



Время [с]

H

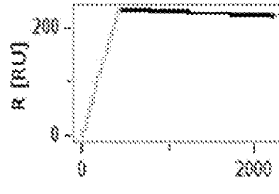
Подгонка графика для H1-P4-E8



Время [с]

I

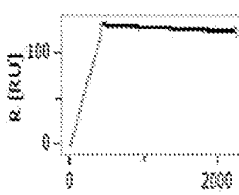
Подгонка графика для H1\_E10



Время [с]

J

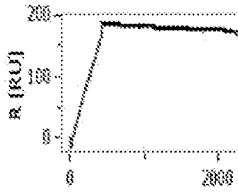
Подгонка графика для H2-P1-B8



Время [с]

K

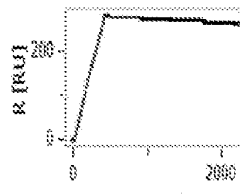
Подгонка графика для H1-P2-G11



Время [с]

L

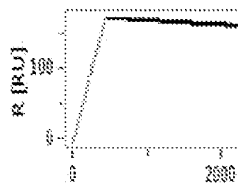
Подгонка графика для H2-B3



Время [с]

M

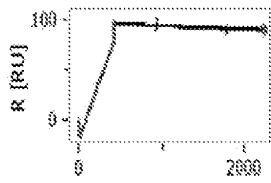
Подгонка графика для H2-P1-F5



Время [с]

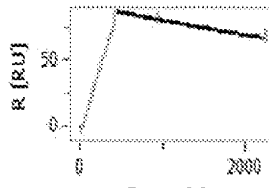
N

Подгонка графика для Н1-Р4-Е11



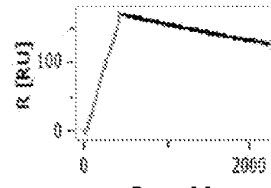
O

Подгонка графика для Н2-Р3-С10



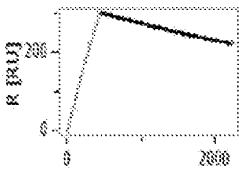
P

Подгонка графика для Н2-Р2-А2

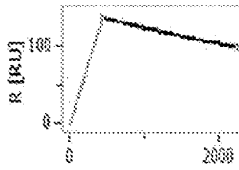


Q

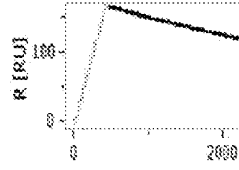
Подгонка графика для прививки FAV Подгонка графика для Н1-Р2-Г6 Подгонка графика для Н2-Р1-Д6 Подгонка графика для Н2-Р3-Е1



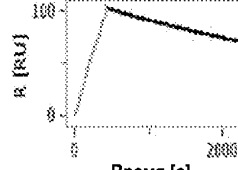
R



S

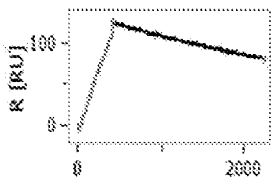


T



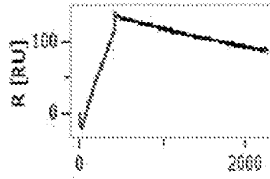
U

Подгонка графика для Н1-Р1-Г8



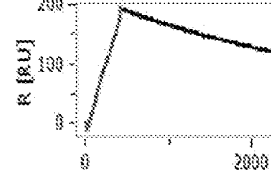
V

Подгонка графика для Н2-Р1-А8



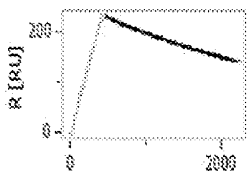
W

Подгонка графика для Н2-Р4-Д7



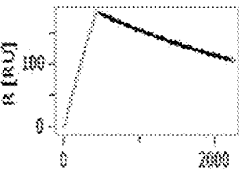
X

Подгонка графика для Н2-Р3-С4



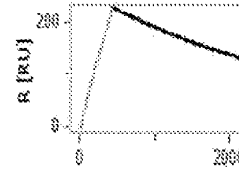
Y

Подгонка графика для Н1\_Д4



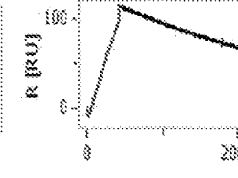
Z

Подгонка графика для Н2-Р2-Ф4



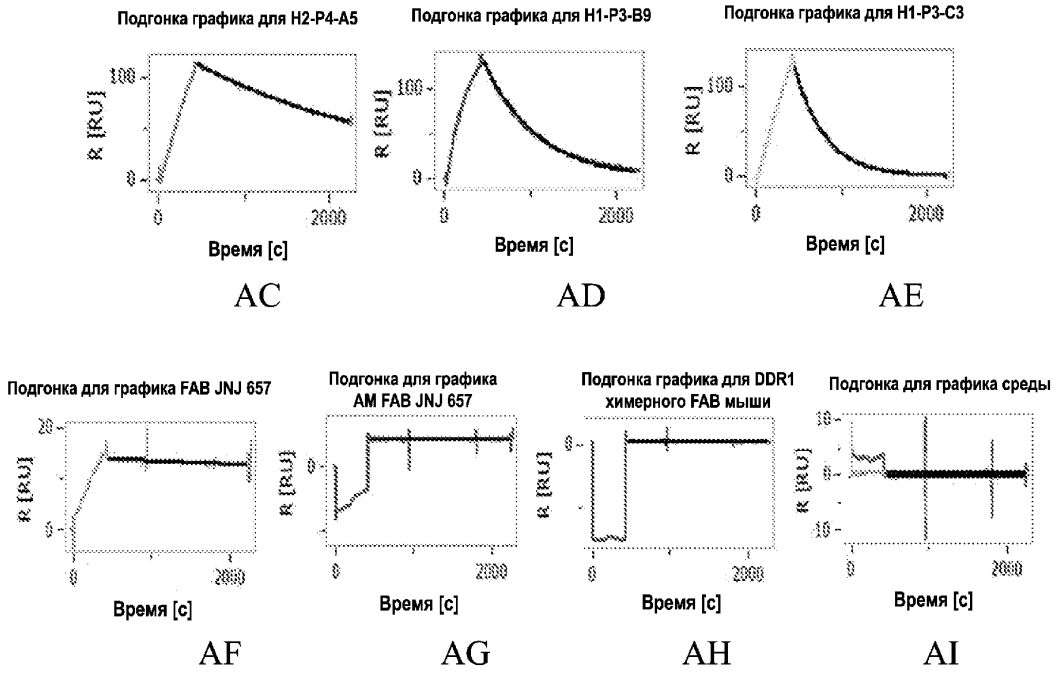
AA

Подгонка графика для Н2-Р2-Ф4

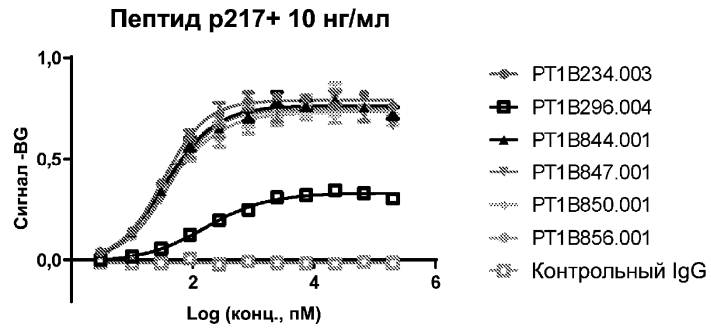


AB



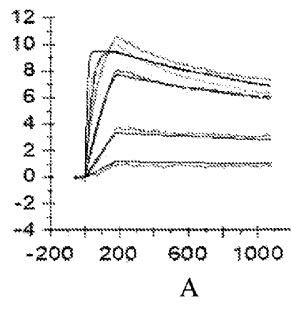


Фиг. 2

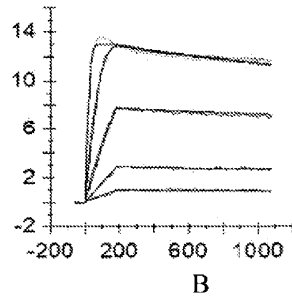


Фиг. 3

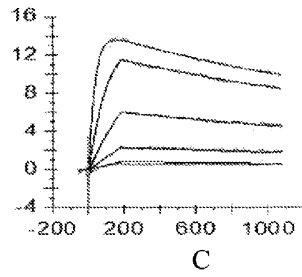
мышинное mAb PT3



PT1B234.003

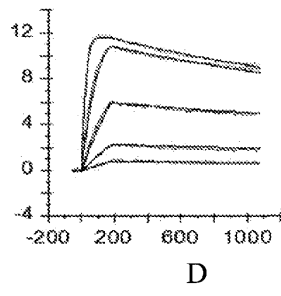


PT1B296

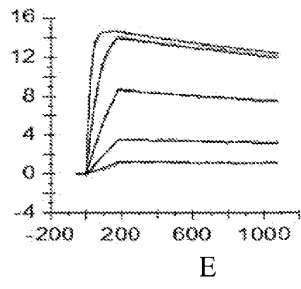


047298

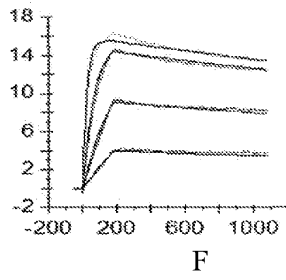
PT1B843.001



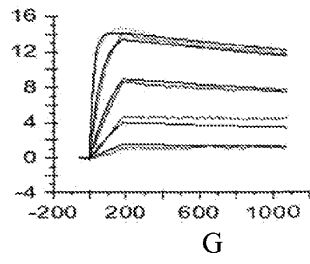
PT1B844.001



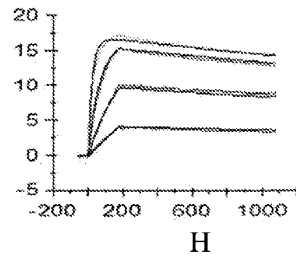
PT1B847.001



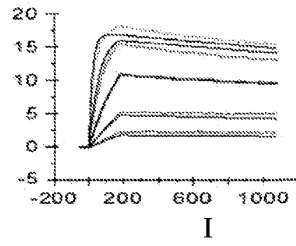
PT18850.001



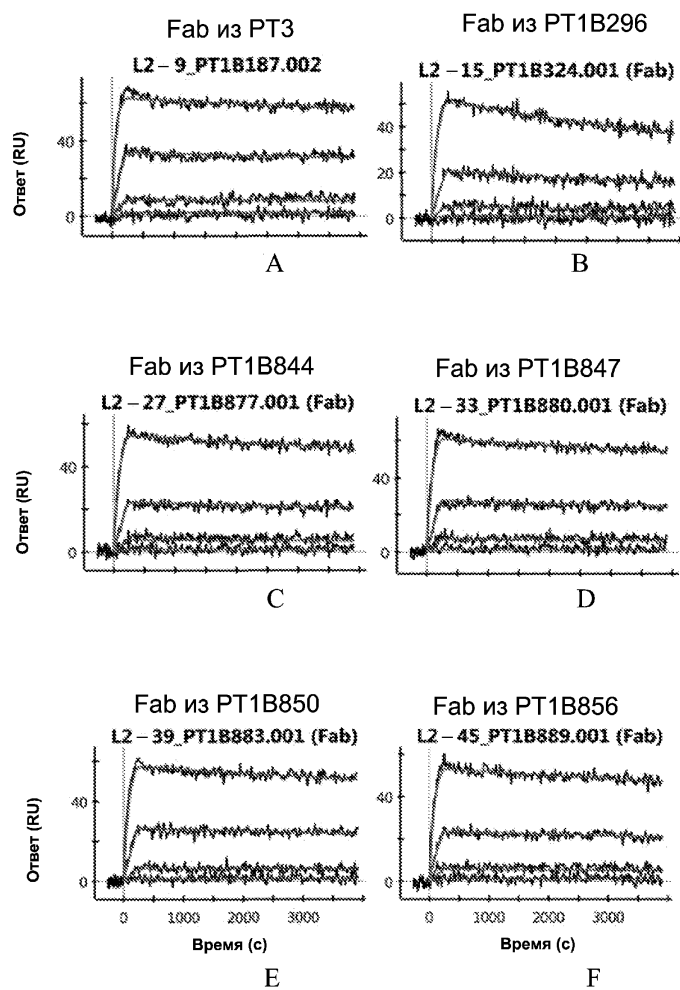
PT18853.001



PT18856.001



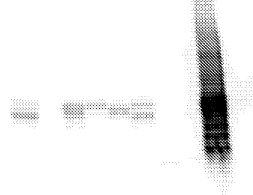
Фиг. 4



Фиг. 5

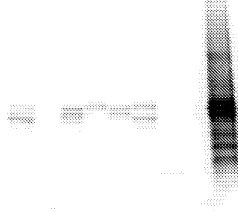
047298

1 2 3 4 5 6 7 8 9



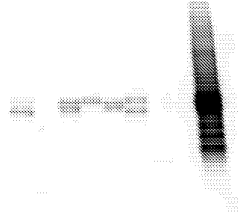
A

1 2 3 4 5 6 7 8 9



B

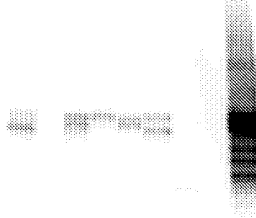
1 2 3 4 5 6 7 8 9



C

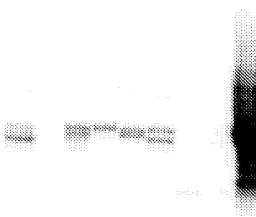
047298

1 2 3 4 5 6 7 8 9



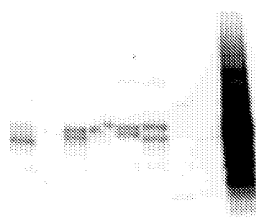
D

1 2 3 4 5 6 7 8 9



E

1 2 3 4 5 6 7 8 9



F

1 2 3 4 5 6 7 8 9

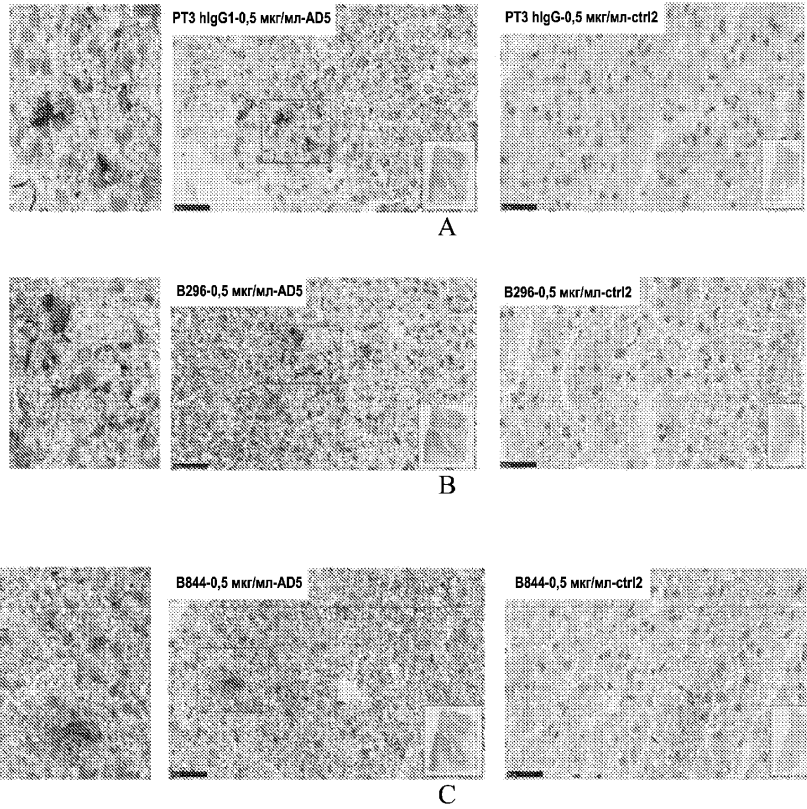


G

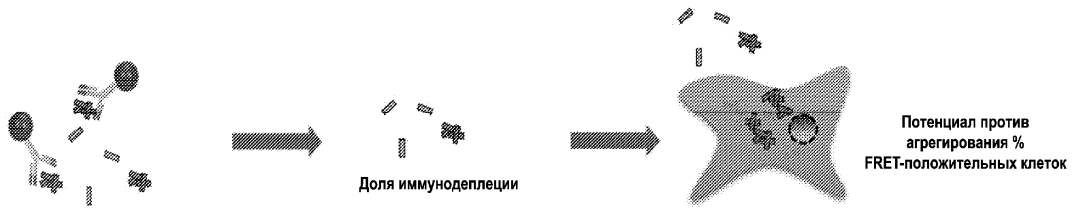
1 2 3 4 5 6 7 8 9



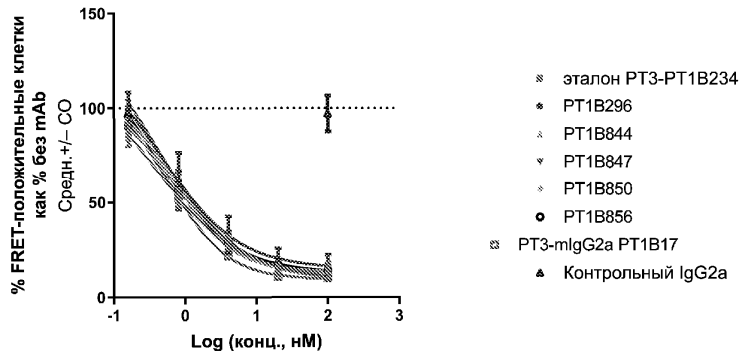
H  
Фиг. 6



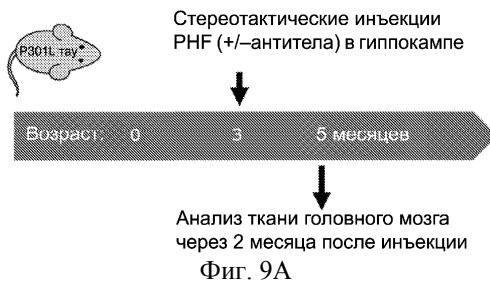
Фиг. 7



Фиг. 8А



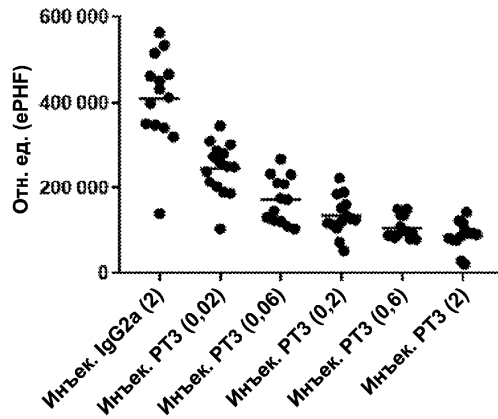
Фиг. 8В



Фиг. 9А

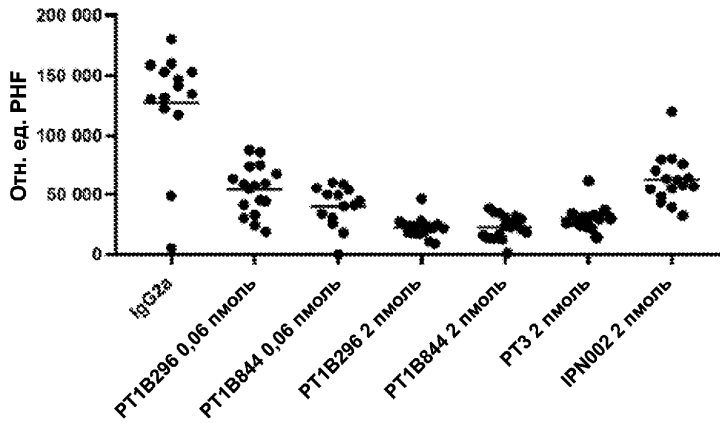


AT8/AT8 на общем гомогенате



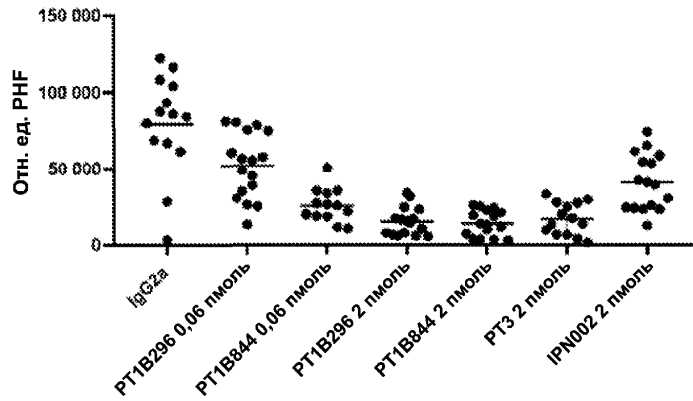
Фиг. 9B

AT8/AT8 на общем гомогенате



Фиг. 9C

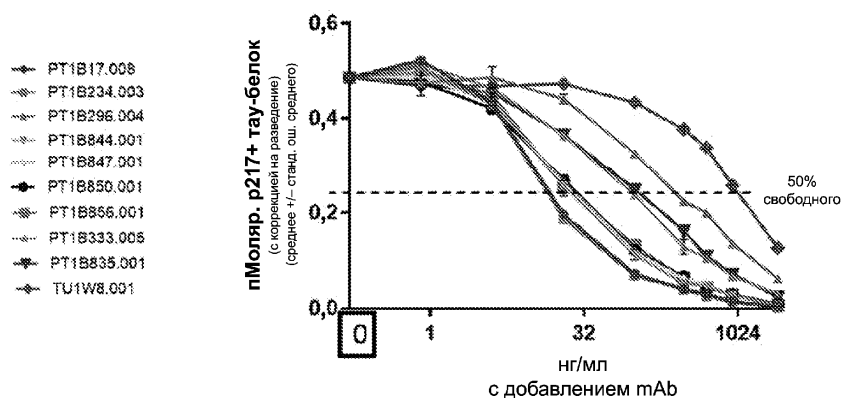
PT51/P51 на нераств. фракции



Фиг. 9D

### СВОБОДНЫЙ p217+ тау-белок

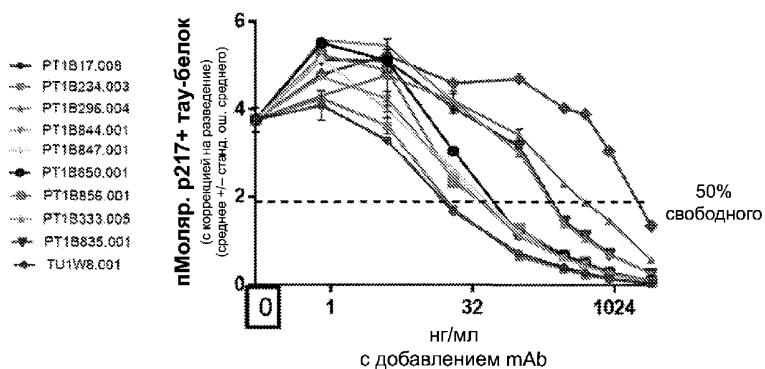
Пул СМЖ с низким содержанием тау-белка



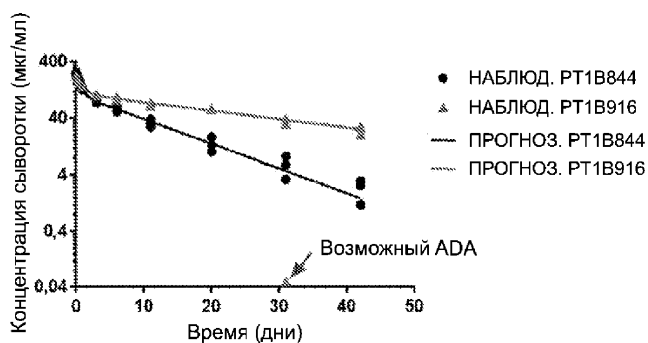
Фиг. 10А

### СВОБОДНЫЙ p217+ тау-белок

Пул СМЖ с высоким содержанием тау-белка



Фиг. 10В



Соединение	5T <sub>1/2</sub> (дни)	
	WT	YTE
PT1B844	6,91	20,05

Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2