

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047459**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.23

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Номер заявки
202192179

(22) Дата подачи заявки
2020.03.02

(54) **АНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ ТАУ**

(31) **62/813,126; 62/813,137; 62/838,159**

(32) **2019.03.03; 2019.03.03; 2019.04.24**

(33) **US**

(43) **2022.01.26**

(86) **PCT/US2020/020704**

(87) **WO 2020/180819 2020.09.10**

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

(72) Изобретатель:
**Ниджджар Тарлохан С., Барбур
Робин, Долан Филип Джеймс III,
Лю Юэ, Александер Светлана, Ренц
Марк Е. (US)**

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

(56) **WO-A1-2017191560
US-B2-9321841**

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с тау. Антитела подавляют или задерживают патологии, связанные с тау, и связанные с ними ухудшения симптомов.

B1

047459

047459

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/813126, поданной 3 марта 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/813137, поданной 3 марта 2019 г., и предварительной заявки на патент США № 62/838159, поданной 24 апреля 2019 г., каждая из которых полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка включает электронный перечень последовательностей, записанный в файле с названием 536323WO_ST25.TXT, созданном 24 февраля 2020 г., составляющем 168875 байт, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей.

Уровень техники

Тау представляет собой хорошо известный белок человека, который может существовать в фосфорилированных формах (см., например, публикации Goedert, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:4051-4055 (1988); Goedert, EMBO J. 8:393-399 (1989); Lee, Neuron 2:1615-1624 (1989); Goedert, Neuron 3:519-526 (1989); Andreadis, Biochemistry 31:10626-10633 (1992)). Сообщалось, что тау играет роль в стабилизации микротрубочек, в частности, в центральной нервной системе. Суммарный тау (с-тау, т.е. фосфорилированная и нефосфорилированная формы) и фосфо-тау (ф-тау, т.е. фосфорилированный тау) высвобождается головным мозгом в ответ на нейрональное повреждение и нейродегенерацию, и, как сообщалось, повышенные уровни тау наблюдаются в СМЖ (спинномозговой жидкости) пациентов, страдающих от болезни Альцгеймера, по сравнению с общей популяцией (Jack et al., Lancet Neurol 9: 119-28 (2010)).

Тау является важнейшим компонентом нейрофибриллярных клубков, которые наряду с бляшками являются характерным признаком болезни Альцгеймера. Клубки образуют аномальные фибриллы, которые составляют 10 нм в диаметре, встречающиеся в парах и перевивающиеся спиральным образом с регулярной периодичностью 80 нм. Тау в нейрофибриллярных клубках является аномально фосфорилированным (гиперфосфорилированным), причем фосфатные группы присоединены к специфичным сайтам на молекуле. При болезни Альцгеймера значительное присутствие нейрофибриллярных клубков наблюдается в слое II нейронов энторинальной области коры, в областях CA1 и областях опорной структуры гиппокампа, миндалевидного тела и в более глубоких слоях (слои III, V и поверхностный VI) неокортекса. Также сообщалось, что гиперфосфорилированный тау препятствует сборке микротрубочек, что может вызвать разрушение нейронной сети.

Включения тау являются частью определения невропатологии нескольких нейродегенеративных болезней, включая болезнь Альцгеймера, лобно-височную лобарную дегенерацию, прогрессирующий надъядерный паралич и болезнь Пика.

Краткое описание заявляемого изобретения

В одном аспекте в настоящем изобретении предложено выделенное антитело, специфично связывающееся с тау человека, содержащее зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO: 8, CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 149, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO: 10, при этом вариабельная область тяжелой цепи является по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 18; и зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO: 12, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO: 150, 151, 153, 156, 158, 159, 160, 163, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173 или 174, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO: 14, при этом вариабельная область легкой цепи является по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 122.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из положений H12, H13, H17, H24, H40, H43, H48, H66, H67, H76, H80, H81 и H91 может быть занято V, K, T, A, R, Q, I, R, A, D, L, Q и F соответственно, и по меньшей мере одно из положений L2, L12, L15, L37, L39, L45, L60 и L100 может быть занято V, P, L, Q, R, R, D и Q соответственно.

В некоторых антителах CDR-L2 содержит SEQ ID NO: 150, 151, 163, 167, 168 или 169. В некоторых антителах вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 18, и вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 110, 121, 122 или 123.

В некоторых антителах вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 110. В некоторых антителах вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 121. В некоторых антителах вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 122. В некоторых антителах вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 123.

В некоторых антителах вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 146, и вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 94 или 122. В некоторых антителах вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 94. В некоторых антителах вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 122.

В некоторых антителах вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 18 или 146, и вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 122.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложено антитело, специфично связывающееся с тау человека, содержащее зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR H1, H2 и H3, содержащую SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно, за исключением того, что положение H28 может быть занято N или T, H54 может быть занято N или D, H56 может быть занято D или E, положение H58 занято

V или I, и положение H60 может быть занято D или E, и зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR L1, L2 и L3, содержащие SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно, за исключением того, что положение L24 может быть занято K или R, положение L50 может быть занято L, E, D, G или V, положение L52 может быть занято S или G и положение L54 может быть занято L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V или S, при этом по меньшей мере одно из следующих положений занято аминокислотой, как указано: H1 занято Q, H5 занято Q, H11 занято L, H20 занято L, H23 занято T, H38 занято K, H75 занято S, H56 занято E, H58 занято I, H60 занято E, H82с занято V, L10 занято T, L17 занято E, L24 занято R, L37 занято Q, L47 занято G, N, D, E, P, T, S или A, L48 занято G или D, L49 занято E, L50 занято E, D, G или V, L52 занято G, L54 занято D, G, N, E, Q, K, R, T, V или S, L83 занято L, L86 занято H, L100 занято Q, L106 занято L.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложено выделенное моноклональное антитело, связывающееся с тау человека, содержащее три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 3D6, при этом 3D6 представляет собой мышиную антитело, характеризующееся вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 7, и вариабельной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 11, за исключением того, что положение H27 может быть занято F или Y, положение H28 может быть занято N или T, положение H29 может быть занято I или F, положение H30 может быть занято K или T, положение H51 может быть занято I или V, положение H54 может быть занято N или D, положение H60 может быть занято D, A или E, положение H61 может быть занято P или E, положение H102 может быть занято F или Y, положение L50 может быть занято L, E, D, G или V, положение L52 может быть занято S или G и положение L54 может быть занято L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V или S, при этом по меньшей мере одно из следующих положений занято аминокислотой, как указано: L37 занято Q, L47 занято G, N, D, E, P, T, S или A, L48 занято G или D, L49 занято E, L50 занято E, D, G или V, L52 занято G, L54 занято D, G, N, E, Q, K, R, T, V или S, L100 занято Q, H60 занято E, H82с занято V.

В некоторых антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86. В некоторых антителах CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 149. В некоторых антителах CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 150 - 175. В некоторых антителах CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 89. В некоторых антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86, и CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87. В некоторых антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86, и CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 88. В некоторых антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86, и CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 92. В некоторых антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60. В некоторых антителах CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 149. В некоторых антителах CDR-H3 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 65. В некоторых антителах CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 150- 175.

Некоторые антитела представляют собой гуманизованное антитело, венерованное антитело или химерное антитело.

Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 76-80 и SEQ ID NO: 90-91, и гуманизованную зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 83-85.

Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 146-148, и гуманизованную зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 93-145.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: H93 занято S и H94 занято T. В некоторых антителах положения H93 и H94 заняты S и T соответственно. В некоторых антителах положение H91 в области VH занято F.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: H1 занято E, H5 занято V, H11 занято V, H20 занято I, H23 занято K, H38 занято R, H42 занято G, H43 занято K, H66 занято R, H75 занято T, H76 занято D, H81 занято E, H108 занято L, H109 занято V. В некоторых антителах положения H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H75, H76, H81, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, L и V соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято ами-

нокислотой, как указано: Н17 занято Т, Н80 занято М, Н83 занято R. В некоторых антителах положения Н17, Н80 и Н83 в области VH заняты Т, М и R соответственно.

В некоторых антителах положение Н58 в области VH занято I.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: Н28 занято Т, Н67 занято V. В некоторых антителах положения Н28 и Н67 в области VH заняты Т и V соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: Н54 занято D, Н56 занято E. В некоторых антителах положения Н54 и Н56 в области VH заняты D и E соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: Н1 занято Q или E, Н5 занято Q или V, Н11 занято L или V, Н17 занято S или T, Н20 занято L или I, Н23 занято T или K, Н28 занято N или T, Н38 занято K или R, Н42 занято E или G, Н43 занято Q или K, Н54 занято N или D, Н56 занято D или E, Н58 занято V или I, Н60 занято D или E, Н66 занято K или R, Н67 занято A или V, Н75 занято S или T, Н76 занято N или D, Н80 занято L или M, Н81 занято Q или E, Н82с занято L или V, Н83 занято T или R, Н91 занято F или Y, Н93 занято S, Н94 занято T, Н108 занято T или L, Н109 занято L или V.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: Н10 занято E или D, Н12 занято K или V, Н13 занято K или R, Н17 занято T, L или S, Н24 занято V или A, Н27 занято F или Y, Н28 занято N или T, Н29 занято I или F, Н30 занято K или T, Н38 занято Q или R, Н40 занято A или R, Н42 занято G или E, Н43 занято K или Q, Н48 занято M или I, Н51 занято V или I, Н54 занято N или D, Н60 занято D, A или E, Н61 занято P или E, Н66 занято R или K, Н67 занято V или A, Н76 занято D или N, Н80 занято M или L, Н81 занято E или Q, Н82а занято S или G, Н82с занято L или V, Н83 занято T или R, Н91 занято Y или F, Н93 занято A или S, Н102 занято F или Y, Н108 занято T или L, Н109 занято L или V.

В некоторых антителах положения Н91, Н93 и Н94 в области VH заняты F, S и T соответственно.

В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н11, Н20, Н23, Н38, Н42, Н43, Н66, Н75, Н76, Н81, Н91, Н93, Н94, Н108 и Н109 в области VH заняты E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, F, S, T, L и V соответственно. В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н11, Н17, Н20, Н23, Н38, Н42, Н43, Н58, Н66, Н75, Н76, Н80, Н81, Н83, Н93, Н94, Н108 и Н109 в области VH заняты E, V, V, T, I, K, R, G, K, I, R, T, D, M, E, R, S, T, L и V соответственно. В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н11, Н17, Н20, Н23, Н28, Н38, Н42, Н43, Н58, Н66, Н67, Н75, Н76, Н80, Н81, Н83, Н93, Н94, Н108 и Н109 в области VH заняты E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, I, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L и V соответственно. В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н11, Н17, Н20, Н23, Н28, Н38, Н42, Н43, Н54, Н56, Н58, Н66, Н67, Н75, Н76, Н80, Н81, Н83, Н93, Н94, Н108 и Н109 в области VH заняты E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, I, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L и V соответственно.

В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н11, Н17, Н20, Н23, Н28, Н38, Н42, Н43, Н54, Н56, Н66, Н67, Н75, Н76, Н80, Н81, Н83, Н91, Н93, Н94, Н108 и Н109 в области VH заняты E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, R, V, T, D, M, E, R, F, S, T, L и V соответственно. В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н11, Н17, Н20, Н23, Н28, Н38, Н42, Н43, Н54, Н56, Н66, Н67, Н75, Н76, Н80, Н81, Н83, Н93, Н94, Н108 и Н109 в области VH заняты E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L и V соответственно.

В некоторых антителах положение Н60 занято E. В некоторых антителах положение Н82С занято V. В некоторых антителах положения Н60, Н80, Н81, Н82с и Н83 заняты E, M, E, V и R соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято аминокислотой, как указано: L7 занято S, L10 занято S, L15 занято L, L83 занято V, L86 занято Y и L106 занято I. В некоторых антителах положения L7, L10, L15, L83, L86 и L106 заняты S, S, L, V, Y и Y соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято аминокислотой, как указано: L7 представляет собой T или S, L10 представляет собой T или S, L15 представляет собой I или L, L17 представляет собой Q или E, L24 представляет собой K или R, L37 представляет собой L или Q, L45 представляет собой K или R, L47 представляет собой L, G, N, D, E, P, T, S или A, L48 представляет собой I, G или D, L49 представляет собой Y или E, L50 представляет собой L, E, D, G или V, L52 представляет собой S или G, L54 представляет собой L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V или S, L83 представляет собой L или V, L86 представляет собой H или Y, L100 представляет собой A или Q, L106 представляет собой L или I.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято аминокислотой, как указано: L2 представляет собой V или I, L7 представляет собой S или T, L12 представляет собой P или S, L15 представляет собой L или I, L36 представляет собой L, L37 представляет собой L или Q, L45 представляет собой R или K, L47 представляет собой L, G, N, D, E, P, T, S или A, L48 представляет собой I, G или D, L49 представляет собой Y или E, L50 представляет собой L, E, D, G или V, L52 представляет собой S или G, L54 представляет собой L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V, L60 представляет собой D или S, L100 представляет собой G или Q.

В некоторых антителах константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 176. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи, слитая с константной областью тяжелой цепи, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178. Некоторые антитела дополнительно содержат сигнальный пептид, слитый со зрелой переменной областью тяжелой и/или легкой цепи. В некоторых антителах тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180. В некоторых антителах константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 177. В некоторых антителах зрелая переменная область легкой цепи, слитая с константной областью легкой цепи, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 179. В некоторых антителах легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181. В некоторых антителах тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178, и легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 179. В некоторых антителах тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180, и легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181.

Некоторые антитела могут содержать по меньшей мере одну мутацию в константной области, такую как мутация, которая снижает фиксацию или активацию комплемента константной областью, например, мутацию в одном или нескольких из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 и 331 согласно нумерации EU. Некоторые антитела содержат аланин в положениях 318, 320 и 322. Некоторые антитела могут являться по меньшей мере на 95% мас./мас. чистыми. Антитело может быть конъюгировано с терапевтическим, цитотоксическим, цитостатическим, нейротрофическим или нейропротекторным средством.

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

В другом аспекте в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и/или легкую цепь любого из описанных в настоящей заявке антител, рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, и клетка-хозяин, трансформированная рекомбинантным вектором экспрессии.

В некоторых нуклеиновых кислотах тяжелая цепь кодируется последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 182, и легкая цепь кодируется последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 183.

Также предложены способы получения антител, таких как гуманизированные, химерные или венированные антитела, например гуманизированные, химерные или венированные формы 3D6. В таких способах клетки, трансформированные нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела, культивируют таким образом, чтобы клетки секретировали антитело. Затем антитело можно очистить из среды для культивирования клеток.

Клеточные линии, продуцирующие любое из описанных в настоящей заявке антител, могут быть получены путем введения вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи антитела, и выбираемого маркера в клетки, путем размножения клеток в условиях для отбора клеток с увеличенным числом копий вектора, выделения отдельных клеток из выбранных клеток; и создания банка клеток, клонированных из одной клетки, выбранной на основе выхода антитела.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую зрелую переменную область тяжелой цепи и зрелую переменную область легкой цепи, функционально связанную с одной или несколькими регуляторными последовательностями, чтобы влиять на экспрессию любого из антител, описанных в настоящей заявке, в клетке млекопитающего. В некоторых векторах экспрессируемое антитело представляет собой scFv или Fab-фрагмент. В некоторых векторах одна или более регуляторных последовательностей включают один или более из промотора, энхансера, сайта связывания рибосомы и сигнала терминации транскрипции. В некоторых векторах нуклеиновая кислота дополнительно кодирует сигнальные пептиды, слитые со зрелыми переменными областями тяжелой и легкой цепей. В некоторых векторах нуклеиновая кислота оптимизирована по кодам для экспрессии в клетке-хозяине. В некоторых векторах одна или более регуляторных последовательностей включают эукариотический промотор. В некоторых векторах нуклеиновая кислота дополнительно кодирует выбранный ген.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы экспрессии антитела в клетке млекопитающего, включающие введение нуклеиновых кислот, описанных в настоящей заявке, в геном трансгенного животного, посредством чего антитело экспрессируется.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложены первый и второй векторы, соответственно, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелую переменную область тяжелой цепи и зрелую переменную область легкой цепи, каждая из которых функционально связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями для воздействия на экспрессию любого из описанных в настоящей заявке антител, и клетка-хозяин, содержащая нуклеиновые кислоты. В некоторых первом и втором векторах нуклеиновые кислоты соответственно дополнительно кодируют константную область тяжелой цепи, слитую со зрелой переменной областью тяжелой цепи, и константную область легкой цепи, слитую со зрелой переменной областью легкой цепи. В некоторых первом и втором векторах константная область тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 176 с С-концевым лизином или

без него, и константная область легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 177.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы экспрессии антитела в клетке млекопитающего, включающие включение любой из нуклеиновых кислот, описанных в настоящей заявке, в геном трансгенного животного, посредством чего антитело экспрессируется.

Также предложены способы получения антител, таких как гуманизованное, химерное или венированное антитело. В таких способах клетки, трансформированные нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела любого из антител, описанных в настоящей заявке, культивируют так, чтобы клетки секретировали антитело. Затем антитело можно очистить из среды для культивирования клеток.

Линии клеток, продуцирующие любое из антител, раскрытых в настоящем документе, можно получить посредством введения в клетки вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи антитела по п.1, и выбираемого маркера, размножения клеток в условиях для отбора клеток, содержащих увеличенное количество копий вектора, выделения единичных клеток из отобранных клеток; и создание банка клеток, клонированных из единичной клетки, отобранной на основании выхода антитела.

Некоторые клетки можно размножить в селективных условиях и провести скрининг в отношении линий клеток, естественным образом экспрессирующих и секретирующих антитело в количестве по меньшей мере 100 мг/л/10⁶ клеток/24 ч. Из отобранных клеток можно выделить единичные клетки. Затем клетки, клонированные из единичной клетки, можно использовать для создания банка клеток. Единичные клетки можно отобрать в зависимости от желаемых свойств, таких как выход антитела. Примеры линий клеток представляют собой линии клеток, экспрессирующие 3D6, или гуманизованные версии 3D6.

В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования или снижения агрегации тау у субъекта, который страдает от опосредованного тау амилоидоза или подвержен риску развития опосредованного тау амилоидоза, причем указанные способы включают введение субъекту эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого ингибирование или снижение агрегации тау у субъекта. Примеры антител включают гуманизованные версии 3D6.

Также предложены способы лечения или осуществления профилактики вызванного тау заболевания у субъекта, причем указанные способы включают введение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого лечение или осуществление профилактики заболевания. Примерами такого заболевания являются болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (Lewy body variant of Alzheimer disease, LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), глобулярная глиальная таупатия (GGT) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). В некоторых способах вызванное тау заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых способах пациент представляет собой носителя ApoE4.

Также предложены способы снижения нарушенной передачи тау, причем указанные способы включают введение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого снижение передачи тау.

Также предложены способы индукции фагоцитоза тау, причем указанные способы включают введение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого индукцию фагоцитоза тау.

Также предложены способы ингибирования агрегации или накопления тау, причем указанные способы включают введение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого ингибирование агрегации или накопления тау.

Также предложены способы ингибирования образования клубков тау, причем указанные способы включают введение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе.

В настоящем изобретении также предложен способ обнаружения отложений тау-белка у субъекта, страдающего от или подверженного риску заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, причем указанные способы включают введение субъекту антитела, раскрытого в настоящем документе, и обнаружение антитела, связавшегося с тау, у субъекта. Примерами такого заболевания являются болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), глобулярная глиальная таупатия (GGT) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). Согласно некоторым вариантам реализации антитело вводят в организм субъекта

посредством внутривенной инъекции. Согласно некоторым вариантам реализации антитело вводят непосредственно в головной мозг субъекта посредством внутричерепной инъекции или посредством сверления отверстия в черепе субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации антитело является меченым. Согласно некоторым вариантам реализации антитело является меченым флуоресцентной меткой, парамагнитной меткой или радиоактивной меткой. Согласно некоторым вариантам реализации радиоактивную метку обнаруживают с применением позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

В настоящем изобретении также предложен способ измерения эффективности лечения у субъекта, который получает лечение заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, причем указанный способ включает измерение первого уровня отложений тау-белка у субъекта до лечения посредством введения субъекту антитела, раскрытого в настоящем документе, и обнаружение первого количества антитела, связавшегося с тау, у субъекта, введение субъекту лечения, измерение второго уровня отложений тау-белка у субъекта после лечения посредством введения субъекту антитела, и обнаружение антитела, связавшегося с тау, у субъекта, причем снижение уровня отложений тау-белка свидетельствует о положительном ответе на лечение.

В настоящем изобретении также предложен способ измерения эффективности лечения у субъекта, который получает лечение заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, причем указанный способ включает измерение первого уровня отложений тау-белка у субъекта до лечения посредством введения субъекту антитела, раскрытого в настоящем документе, и обнаружение первого количества антитела, связавшегося с тау, у субъекта, введение субъекту лечения, измерение второго уровня отложений тау-белка у субъекта после лечения посредством введения субъекту антитела, и обнаружение второго количества антитела, связавшегося с тау, у субъекта, причем отсутствие изменения уровня отложений тау-белка или незначительное увеличение отложений тау-белка свидетельствует о положительном ответе на лечение.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения антитела, которое специфично связывается с тау человека с эпитопом в пределах мотива формулы KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO:191) или KIGSLDNITH (SEQ ID NO:194), включающий иммунизацию животного тау человека или его фрагментом для получения антител и скрининг продуцируемых антител на антитела, которые специфично связываются с мотивом. В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения антитела, которое специфично связывается с пептидом, содержащим остатки KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO:191) или KIGSLDNITH (SEQ ID NO:194), включающий иммунизацию животного тау человека или его фрагментом для получения антител и скрининг продуцируемых антител на антитела, которые специфично связываются с пептидом. В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения антитела, которое специфично связывается эпитопом, содержащим KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO:191), включающий иммунизацию животного тау человека или его фрагментом для получения антител и скрининг продуцируемых антител на антитела, которые специфично связываются с эпитопом.

В некоторых способах животное иммунизируют тау человека из 383 аминокислот (4R0N). В некоторых способах тау человека содержит мутацию P301S. В некоторых способах тау человека является рекомбинантным с His-меткой на N-конце.

В некоторых способах скрининг определяет специфическое связывание между антителами и одним или более пептидами, содержащими до 15 аминокислот, включая KIGSTENLKH (SEQ ID NO:188), KCGSKDNIKH (SEQ ID NO:192), KCGSLGNINH (SEQ ID NO:193) соответственно или любой другой консенсусный мотив, представленный KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO:191).

В некоторых способах один или более пептидов содержат KIGSTENLKH (SEQ ID NO:188) или KCGSKDNIKH (SEQ ID NO:192) или KCGSLGNINH (SEQ ID NO:193), соответственно. В некоторых способах животное иммунизируют фрагментом тау из 15 аминокислот, содержащим KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO:191), связанным с носителем. В некоторых способах пептид представляет собой KIGSTENLKH (SEQ ID NO:188) или KCGSKDNIKH (SEQ ID NO:192) или KCGSLGNINH (SEQ ID NO:193).

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены результаты экспериментов, разработанных для картирования эпитопа(ов), связанного мышинным моноклональным антителом 3D6.

На фиг. 2 показано выравнивание переменных областей тяжелой цепи мышинового антитела 3D6 (SEQ ID NO: 7) и гуманизованных версий антитела 3D6 (hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6 и hu3D6VHvb7) с последовательностью переменной области тяжелой цепи зародышевой линии человека IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) и последовательностью переменной области тяжелой цепи акцептора человека 2RCS VH hFgwk (SEQ ID NO: 75). hu3D6VHvb1 представляет собой SEQ ID NO: 76, hu3D6VHvb2 представляет собой SEQ ID NO: 77, hu3D6VHvb3 представляет собой SEQ ID NO: 78, hu3D6VHvb4 представляет собой SEQ ID NO: 79, hu3D6VHvb5 представляет собой SEQ ID NO: 80, hu3D6VHvb6 представляет собой SEQ ID NO: 90 и hu3D6VHvb7 представляет собой SEQ ID NO: 91. CDR, определенные согласно сводному определению Кэбота/Чотиа, выделены жирным шрифтом.

На фиг. 3 показано выравнивание переменных областей легкой цепи мышинового антитела 3D6 (SEQ ID NO: 11) и гуманизованных версий антитела 3D6 (hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2 и hu3D6VLvb3) с последовательностью переменной области легкой цепи зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) и с человеческим акцептором ARX71335_VL_hFrwk (SEQ ID NO: 82). hu3D6VLvb1 представляет собой SEQ ID NO: 83, hu3D6VLvb2 представляет собой SEQ ID NO: 84 и hu3D6VLvb3 представляет собой SEQ ID NO: 85. CDR, как определено согласно Кэботу, выделены жирным шрифтом.

На фиг. 4А, 4В и 4С показаны результаты скрининговых анализов ELISA для выбранных мышинных моноклональных антител против тау.

На фиг. 5 представлена кинетика связывания отобранных моноклональных антител мыши против тау с рекомбинантным тау человека.

На фиг. 6 представлены результаты функциональных блокирующих анализов отобранных моноклональных антител мыши против тау.

На фиг. 7 представлены результаты анализов дезагрегации отобранных моноклональных антител мыши против тау.

На фиг. 8 представлены результаты экспериментов, демонстрирующие, что 3D6 и 5G8 иммунным способом захватывают тау из ткани, пораженной болезнью Альцгеймера человека.

На фиг. 9А и 9В показаны выравнивания переменной области тяжелой цепи мышинового 3D6 (SEQ ID NO: 7) и гуманизованных версий антитела 3D6 (hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6, hu3D6VHvb7, hu3D6VHv1bA11, h3D6VHvb8 и h3D6VHvb9) с последовательностью переменной области тяжелой цепи зародышевой линии человека IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) и последовательностью переменной области тяжелой цепи акцептора человека 2RCS VH hFrwk (SEQ ID NO: 75). hu3D6VHvb1 представляет собой SEQ ID NO: 76, hu3D6VHvb2 представляет собой SEQ ID NO: 77, hu3D6VHvb3 представляет собой SEQ ID NO: 78, hu3D6VHvb4 представляет собой SEQ ID NO: 79, hu3D6VHvb5 представляет собой SEQ ID NO: 80, hu3D6VHvb6 представляет собой SEQ ID NO: 90, hu3D6VHvb7 представляет собой SEQ ID NO: 91, hu3D6VHv1bA11 представляет собой SEQ ID NO: 18, h3D6VHvb8 представляет собой SEQ ID NO: 146 и h3D6VHvb9 представляет собой SEQ ID NO: 148. Остатки, идентичные остаткам переменной области тяжелой цепи мышинового 3D6 (SEQ ID NO: 7), обозначены знаком "." CDR, определенные согласно сводному определению Кэбота/Чотиа, выделены жирным шрифтом.

На фиг. 10А, 10В, 10С и 10D показаны выравнивания переменной области легкой цепи гуманизованных версий антитела 3D6:

hu3D6VLv2 (SEQ ID
NO:21), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103),
hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54D
(SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101),
hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128),
hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131),
hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125),
hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127),
hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID
NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R
(SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2
L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121),
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID
NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2
L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ
ID NO:137), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2
L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ
ID NO:139) и hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138).

Остатки, идентичные остаткам переменной области легкой цепи hu3D6VLv2 (SEQ ID NO: 21), обозначены знаком "." CDR, как определено согласно Кэботу, выделены жирным шрифтом.

На фиг. 11 показаны результаты анализа интернализации для выбранных гуманизованных вариантов 3D6.

На фиг. 12А и 12В показаны результаты экспериментов картирования замен на микрочипах. На фиг. 12А показан график эффекта замены, и на фиг. 12В показано выравнивание частей повторов связывания тау микротрубочек с выделенными важными остатками для связывания 3D6. Остатки аминокислот 255-271 представляют собой SEQ ID NO: 184, остатки аминокислот 286-302 представляют собой SEQ ID

NO: 185, остатки аминокислот 317-333 представляют собой SEQ ID NO: 186 и остатки аминокислот 349-365 представляют собой SEQ ID NO: 187.

На фиг. 13 показаны результаты экспериментов иммуногистохимии, которые показывают, как 3D6 связывается с тау в нормальной ткани (верхняя панель) и в ткани при болезни Альцгеймера (средняя и нижняя панели).

На фиг. 14 показаны результаты экспериментов масс-спектрометрии для оценки стехиометрии связывания 3D6.

На фиг. 15 показано, что 3D6 прерывает образование зерен тау в модели болезни Альцгеймера *in vivo*.

На фиг. 16 показано, что гуманизированные варианты 3D6 hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 и hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 блокируют взаимодействие между тау и гепарином.

На фиг. 17 показано, что гуманизированные варианты 3D6 hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 и hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 связываются с фибриллярными формами тау.

Краткое описание последовательностей

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

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

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

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

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

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

В SEQ ID NO: 7 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 3D6 мыши.

В SEQ ID NO: 8 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 3D6 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа.

В SEQ ID NO: 9 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 3D6 мыши согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 10 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 3D6 мыши согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 11 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 3D6 мыши и антитела 6A10 мыши.

В SEQ ID NO: 12 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 3D6 мыши и антитела 6A10 мыши согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 13 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 антитела 3D6 мыши и антитела 6A10 мыши согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 14 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 3D6 мыши и антитела 6A10 мыши согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 15 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHv1.

В SEQ ID NO: 16 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHv2.

В SEQ ID NO: 17 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHv1b.

В SEQ ID NO: 18 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHv1bA11.

В SEQ ID NO: 19 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHv5.

В SEQ ID NO: 20 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLv1.

В SEQ ID NO: 21 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLv2.

В SEQ ID NO: 22 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLv3.

В SEQ ID NO: 23 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLv4.

В SEQ ID NO: 24 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи акцептора с учетн. № BAC01986.1.

В SEQ ID NO: 25 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи акцептора с учетн. № IMGT# IGHV1-69-2*01.

В SEQ ID NO: 26 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи акцептора с учетн. № IMGT#IGKJ1*01.

В SEQ ID NO: 27 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи акцептора с учетн. № IMGT#IGKV2-30*02

В SEQ ID NO: 28 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи акцептора с учетн. № IMGT#IGKJ2*01.

В SEQ ID NO: 29 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи акцептора с учетн. № AAZ09048.1.

В SEQ ID NO: 30 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи антитела 3D6 мыши.

В SEQ ID NO: 31 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область легкой цепи антитела 3D6 мыши.

В SEQ ID NO: 32 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 3D6 мыши согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 33 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 3D6 мыши согласно Чотиа.

В SEQ ID NO: 34 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 3D6 мыши согласно Чотиа.

В SEQ ID NO: 35 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 3D6 мыши согласно AbM.

В SEQ ID NO: 36 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 3D6 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 37 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 антитела 3D6 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 38 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 3D6 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 39 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 3D6 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 40 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 3D6 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 41 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 3D6 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 42 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H1 гуманизованного антитела 3D6 (как в hu3D6VHv5, hu3D6VHv1bA11B6G2, hu3D6VHv1bA11B6H3, hu3D6VHv1e и hu3D6VHv1f) согласно сводному определению Кэбота-Чотиа.

В SEQ ID NO: 43 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H2 гуманизованного антитела 3D6 (как в hu3D6VHv5 и hu3D6VHv1bA11B6H3) согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 44 представлена консенсусная аминокислотная последовательность вариабельных областей тяжелой цепи 3D6 мыши и отобранных гуманизованных антител 3D6 (VHv1, VHv2, VHv1b, VHv1bA11 и VHv5) (отмечена "Большинство" на фиг. 2 в PCT/IB2017/052544).

В SEQ ID NO: 45 представлена консенсусная аминокислотная последовательность между вариабельными областями легкой цепи 3D6 мыши и отобранными гуманизованными антителами 3D6 (отмечена "Большинство" на фиг. 3 в PCT/IB2017/052544).

В SEQ ID NO: 46 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv1bA11B6G2.

В SEQ ID NO: 47 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv1bA11B6H3.

В SEQ ID NO: 48 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv1c.

В SEQ ID NO: 49 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv1d.

В SEQ ID NO: 50 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv1e.

В SEQ ID NO: 51 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv1f.

В SEQ ID NO: 52 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv3.

В SEQ ID NO: 53 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv3b.

В SEQ ID NO: 54 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой

цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv3c.

В SEQ ID NO: 55 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv4.

В SEQ ID NO: 56 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv4b.

В SEQ ID NO: 57 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv4c.

В SEQ ID NO: 58 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H1 гуманизованного антитела 3D6 (как в hu3D6VH1c) согласно сводному определению Кэбота-Чотиа.

В SEQ ID NO: 59 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H1 гуманизованного антитела 3D6 (как в hu3D6VHv1d, hu3D6VHv3c и hu3D6VHv4c) согласно сводному определению Кэбота-Чотиа.

В SEQ ID NO: 60 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H1 гуманизованного антитела 3D6 (как в hu3D6VHv3b и hu3D6VHv4b) согласно сводному определению Кэбота-Чотиа.

В SEQ ID NO: 61 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H2 гуманизованного антитела 3D6 (как в hu3D6VHv1bA11B6G2) согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 62 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H2 гуманизованного антитела 3D6 (как в hu3D6VHv1c, hu3D6VHv3b и hu3D6VHv4b) согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 63 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H2 гуманизованного антитела 3D6 (получено как в hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3c и hu3D6VHv4c) согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 64 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H2 гуманизованного антитела 3D6 (как в hu3D6VHv1e) согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 65 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H3 гуманизованного антитела 3D6 (как в hu3D6VHv1f) согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 66 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 6A10 мыши.

В SEQ ID NO: 67 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 6A10 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа.

В SEQ ID NO: 68 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 6A10 мыши согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 69 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 6A10 мыши согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 70 представлена аминокислотная последовательность области VH антитела мыши (код pdb 1CR9), которую использовали в качестве структурной матрицы для гуманизации тяжелой цепи.

В SEQ ID NO: 71 представлена консенсусная аминокислотная последовательность вариабельных областей тяжелой цепи отобранных гуманизованных антител

3D6 (VHv1, VHv1b, VHv1bA11, VHv1bA11B6G2, VHv1bA11B6H3, VHv1c,

VHv1d, VHv1e, VHv1f, VHv2, VHv3, VHv3b, VHv3c, VHv4, VHv4b, VHv4c и VHv5)

(на фиг. 4A и 4B отмечена "Большинство" в PCT/IB2017/052544).

В SEQ ID NO: 72 представлена аминокислотная последовательность тяжелой цепи химерного антитела 3D6.

В SEQ ID NO: 73 представлена аминокислотная последовательность легкой цепи химерного антитела 3D6.

В SEQ ID NO: 74 представлена аминокислотная последовательность вариабельной структурной модели тяжелой цепи с учетн. № 5MYX-VH_mSt.

В SEQ ID NO: 75 представлена аминокислотная последовательность вариабельного акцептора тяжелой цепи с учетн. № 2RCS-VH_huFrwk.

В SEQ ID NO: 76 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHvb1.

В SEQ ID NO: 77 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHvb2.

В SEQ ID NO: 78 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHvb3.

В SEQ ID NO: 79 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHvb4.

В SEQ ID NO: 80 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHvb5.

В SEQ ID NO: 81 представлена аминокислотная последовательность вариабельной структурной модели легкой цепи с учетн. № 5MYX-VL_mSt.

В SEQ ID NO: 172 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-L2 гуманизированного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R и в hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q).

В SEQ ID NO: 173 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-L2 гуманизированного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G).

В SEQ ID NO: 174 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-L2 гуманизированного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R).

В SEQ ID NO: 175 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-L2 гуманизированного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_L50VL54D_G100Q).

В SEQ ID NO: 176 представлена аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи (IgG1: аллотип G1m17,1).

В SEQ ID NO: 177 представлена аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (каппа)

В SEQ ID NO: 178 представлена аминокислотная последовательность зрелой тяжелой цепи гуманизированного варианта 3D6 (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 аллотип)

В SEQ ID NO: 179 представлена аминокислотная последовательность зрелой легкой цепи гуманизированного варианта 3D6 (hu3D6VLv2 вариант L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 каппа)

В SEQ ID NO: 180 представлена аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного варианта 3D6 (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 аллотип) с сигнальным пептидом бычьего альфа-лактальбумина на N-конце

В SEQ ID NO: 181 представлена аминокислотная последовательность легкой цепи гуманизированного варианта 3D6 (hu3D6VLv2 вариант L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 каппа) с сигнальным пептидом бычьего альфа-лактальбумина на N-конце.

В SEQ ID NO: 182 представлена нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь гуманизированного варианта 3D6 (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 аллотип) с сигнальным пептидом бычьего альфа-лактальбумина на N-конце

В SEQ ID NO: 183 представлена нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь гуманизированного варианта 3D6 (hu3D6VLv2 вариант L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 каппа) с сигнальным пептидом бычьего альфа-лактальбумина на N-конце

В SEQ ID NO: 184 представлена аминокислотная последовательность повтора 1 области связывания микротрубочек тау (остатки аминокислот 255-271 SEQ ID NO: 1)

В SEQ ID NO: 185 представлена аминокислотная последовательность повтора 2 области связывания микротрубочек тау (остатки аминокислот 286-302 SEQ ID NO: 1)

В SEQ ID NO: 186 представлена аминокислотная последовательность повтора 3 области связывания микротрубочек тау (остатки аминокислот 317-333 SEQ ID NO: 1)

В SEQ ID NO: 187 представлена аминокислотная последовательность повтора 4 области связывания микротрубочек тау (остатки аминокислот 349-365 SEQ ID NO: 1)

В SEQ ID NO: 188 представлена аминокислотная последовательность корового мотива тау в MBTR 1, связанном с 3D6

В SEQ ID NO: 189 представлена аминокислотная последовательность N-конца последовательности тау по отношению к коровому мотиву тау в MBTR 1, связанном с 3D6

В SEQ ID NO: 190 представлена аминокислотная последовательность C-конца последовательности тау по отношению к коровому мотиву тау в MBTR 1, связанном с 3D6

В SEQ ID NO: 191 представлена аминокислотная последовательность эпитопа 3D6

В SEQ ID NO: 192 представлена аминокислотная последовательность корового мотива тау в MBTR 2, связанном с 3D6

В SEQ ID NO: 193 представлена аминокислотная последовательность корового мотива тау в MBTR 3, связанном с 3D6

В SEQ ID NO: 194 представлена аминокислотная последовательность корового мотива тау в MBTR 4, связанном с 3D6

Определения.

Моноклональные антитела или другие биологические молекулы, как правило, представлены в выделенной форме. Это означает, что антитело или другая биологическая молекула, как правило, являются по меньшей мере на 50% мас./мас. чистыми от интерферирующих белков и других загрязняющих веществ, образующихся в процессе их получения или очистки, но не исключает возможности, что моноклональное антитело объединено с избытком фармацевтически приемлемого носителя или носителей либо другого наполнителя, предназначенного для облегчения применения антитела. Иногда моноклональные антитела являются по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% мас./мас. чистыми от интерферирующих белков и загрязняющих веществ, образующихся в процессе получения или очистки. Часто выделенное моноклональное антитело или другая биологическая молекула является доминирующим макромолекулярным компонентом, остающимся после его очистки.

Специфичное связывание антитела с его антигеном-мишенью означает аффинность и/или авид-

ность, составляющую по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , или 10^{12} М⁻¹. Специфичное связывание является обнаруживаемо более высоким по величине и различимым от неспецифичного связывания, возникающего с по меньшей мере одной неродственной мишенью. Специфичное связывание может являться следствием образования связей между конкретными функциональными группами или конкретной пространственной укладкой (например, по типу замка и ключа), тогда как неспецифичное связывание обычно является следствием вандерваальсовых сил. Однако специфичное связывание не обязательно подразумевает, что антитело связывается с одной и только одной мишенью.

Основной структурной единицей антитела является тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50 - 70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит переменную область из приблизительно 100 - 110 или более аминокислот, отвечающих, главным образом, за распознавание антигена. Данная переменная область изначально экспрессируется связанной с отщепляемым сигнальным пептидом. Переменную область без сигнального пептида иногда называют зрелой переменной областью. Таким образом, например, зрелая переменная область легкой цепи означает переменную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, отвечающую, главным образом, за эффекторную функцию.

Легкие цепи классифицируют на каппа или лямбда. Тяжелые цепи, которые классифицируют на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В пределах легких и тяжелых цепей переменные и константные области связаны "J"-областью, состоящей из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также содержит "D"-область, состоящую приблизительно из 10 или более аминокислот. (См., в общих чертах, руководство *Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 (полностью включено посредством ссылки для всех целей)).

Переменная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (которую также называют в настоящем документе "переменной областью легкой цепи" ("домен VL") или "переменная область тяжелой цепи" ("домен VH"), соответственно) состоит из "каркасного" участка (framework, FR), который перемежается тремя "участками, определяющими комплементарность" или "CDR" (complementarity determining regions). Каркасные участки служат для выравнивания CDR с целью специфичного связывания с эпитопом антигена. CDR содержат остатки аминокислот антитела, отвечающие, главным образом, за связывание с антигеном. От аминоконца к карбоксиконцу как домены VL, так и домены VH содержат следующие каркасные (FR) участки и участки CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR 1, 2 и 3 домена VL также называют в настоящем документе, соответственно, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; CDR 1, 2 и 3 домена VH также называют в настоящем документе, соответственно, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. Когда в заявке описана последовательность VL с R в качестве C-концевого остатка, R альтернативно можно рассматривать как N-концевой остаток константной области легкой цепи. Таким образом, настоящую заявку также следует понимать как описание последовательности VL без C-концевого R.

Распределение аминокислот к каждому из доменов VL и VH происходит в соответствии с любым общепринятым определением CDR. Общепринятые определения включают определение Кэбота (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), определение Чотиа (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342:878-883, 1989); сводное определение CDR Чотиа и Кэбота, в котором CDR-H1 представляет собой сводное определение CDR Чотиа и Кэбота; определение AbM, используемое в программном обеспечении для молекулярного моделирования антител Оксфордского университета; и контактное определение согласно Martin et al. (bioinfo.org.uk/abs) (см. табл. 1). Определение согласно Кэботу обеспечивает широко используемую систему нумерации (нумерацию Кэбота), в которой соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями присваивают одинаковый номер. Когда говорят, что антитело содержит CDR согласно конкретному определению CDR (например, Кэботу), данное определение указывает на минимальное количество остатков CDR, присутствующих в антителе (т.е. CDR согласно Кэботу). Это не исключает того, что также присутствуют другие остатки, попадающие под другое общепринятое определение CDR, но за пределами указанного определения. Например, антитело, содержащее CDR, определенные согласно Кэботу, включает, среди других возможностей, антитело, в котором CDR содержат остатки CDR согласно Кэботу и не содержат другие остатки CDR, и антитело, в котором CDR H1 представляет собой CDR H1 согласно сводному определению Чотиа-Кэбота, а другие CDR содержат остатки CDR согласно Кэботу и не содержат дополнительные остатки CDR на основании других определений.

Таблица 1
Общепринятые определения CDR с применением нумерации Кэбота

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

* CDR-H1 согласно Чотиа может заканчиваться на H32, H33 или H34 (в зависимости от длины петли). Это обусловлено тем, что схема нумерации Кэбота размещает вставки дополнительных остатков в 35A и 35B, тогда как нумерация Чотиа размещает их в 31A и 31B. Если ни H35A, ни H35B (нумерация Кэбота) не присутствуют, петля CDR-H1 Чотиа заканчивается на H32. Если присутствует только H35A, данная петля заканчивается на H33. Если присутствуют как H35A, так и H35B, данная петля заканчивается на H34.

Термин "антитело" включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены, за специфичное связывание с мишенью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂c, Dab, нанотела и Fv. Фрагменты можно получить посредством методик рекомбинантной ДНК или посредством ферментативного или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин "антитело" также включает биспецифичное антитело и/или гуманизированное антитело. Биспецифичное или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, которое содержит две различные пары тяжелой/легкой цепей и два различных связывающих сайта (см., например, публикации Songvilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)). В некоторых биспецифичных антителах две различные пары тяжелой/легкой цепей содержат пару тяжелой цепи/легкой цепи гуманизированного 3D6 и пару тяжелой цепи/легкой цепи, специфичную в отношении отличного эпитопа на тау, чем таковой, с которым связывается 3D6.

В некоторых биспецифичных антителах одна пара тяжелой цепи/легкой цепи представляет собой гуманизированное антитело 3D6, как более подробно раскрыто ниже, а другая пара тяжелой цепи/легкой цепи получена из антитела, которое связывается с рецептором, который экспрессирован на гематоэнцефалическом барьере, таким как инсулиновый рецептор, рецептор инсулиноподобного фактора роста (ИФР), лептиновый рецептор или липопротеиновый рецептор, или трансферриновый рецептор (Friden et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775, 1991; Friden et al., *Science* 259:373-377, 1993). Такое биспецифичное антитело может переноситься через гематоэнцефалический барьер в результате рецепторопосредованного трансцитоза. Поглощение биспецифичного антитела головным мозгом можно дополнительно усилить посредством конструирования биспецифичного антитела с целью снижения его аффинности к рецептору гематоэнцефалического барьера. Сниженная аффинность к рецептору приводила к более широкому распределению в головном мозге (см., например, публикации Atwal et al., *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu et al., *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

Примеры биспецифичных антител могут также представлять собой: (1) антитело с двойным вариабельным доменом (dual-variable-domain antibody, DVD-Ig), в котором каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два вариабельных домена в тандеме через короткую пептидную связь (Wu et al., *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule*, In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab (тандемное антитело), которое представляет собой слияние двух одноцепочечных диател с получением тетравалентного биспецифичного антитела, содержащего два связывающих сайта для каждого из антигенов-мишеней; (3) антитело flexibody, которое представляет собой комбинацию scFv с диателом с получением мультивалентной молекулы; (4) так называемую молекулу, полученную методом "замка на причале" ("dock and lock"), на основе "домена димеризации и до-

кинга" в протеинкиназе А, которая при применении с Fab позволяет получить тривалентный биспецифичный связывающий белок, состоящий из двух идентичных Fab-фрагментов, присоединенных к отличному Fab-фрагменту; или (5) так называемую молекулу Scorpion, содержащую, например, два scFv, слитых с обоими концами Fc-области человека. Примеры платформ, пригодных для получения биспецифичных антител, включают BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab и Mab2 (F-star), Fc-сконструированный IgG1 (Xencor) или DuoBody (на основе замены плеча Fab, Genmab).

Термин "эпитоп" означает сайт на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, которые сблизились в результате третичного фолдинга одного или нескольких белков. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами (также известны как линейные эпитопы), как правило, устойчивы к воздействию денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные в результате третичного фолдинга (также известны как конформационные эпитопы), обычно разрушаются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 3 или более, чаще не менее 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, руководство Epitope Mapping Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Антитела, которые распознают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы, можно идентифицировать с помощью обычного иммунного анализа, выявляющего способность одного антитела конкурировать со связыванием другого антитела с антигеном-мишенью. Эпитоп антитела может быть также определен с помощью рентгеновской кристаллографии антитела, связанного со своим антигеном, для идентификации контактных остатков. В качестве альтернативы, два антитела нацелены на один и тот же эпитоп, если все мутации аминокислот в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, также уменьшают или устраняют связывание другого антитела. Два антитела нацелены на перекрывающиеся эпитопы, если мутации некоторых аминокислот, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого антитела.

Конкуренцию между антителами определяют с помощью анализа, в котором исследуемое антитело ингибирует специфичное связывание эталонного антитела с известным антигеном (см., например, публикацию Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Исследуемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток исследуемого антитела (например, по меньшей мере 2-кратный, 5-кратный, 10-кратный, 20-кратный или 100-кратный) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 50% по результатам измерения в анализе конкурентного связывания. Некоторые исследуемые антитела ингибируют связывание эталонных антител по меньшей мере на 75%, 90% или 99%. Антитела, идентифицированные с помощью конкурентного анализа (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным достаточно проксимально по отношению к эпитопу, с которым связывается эталонное антитело, для возникновения стерического барьера.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или вспомогательное средство является совместимым с другими компонентами состава и не является по существу вредным в отношении его реципиента.

Термин "пациент" включает человека или других субъектов-млекопитающих, получающих профилактическое или терапевтическое лечение.

Индивидуум подвержен увеличенному риску развития заболевания, если субъект характеризуется по меньшей мере одним известным фактором риска (например, генетический, биохимический, семейный анамнез и воздействие ситуационных факторов), который подвергает индивидуумов с данным фактором риска статистически значимому большему риску развития заболевания по сравнению с индивидуумами без фактора риска.

Термин "биологический образец" означает образец биологического материала в биологическом источнике или получаемого из биологического источника, например человека или субъекта-млекопитающего. Такие образцы могут представлять собой органы, органеллы, ткани, срезы тканей, жидкости организма, периферическую кровь, плазму крови, сыворотку крови, клетки, молекулы, такие как белки и пептиды, и любые части или комбинации, полученные из указанных образцов. Термин "биологический образец" может также охватывать любой материал, полученный в результате обработки образца. Полученный материал может включать клетки или их потомство. Обработка биологического образца может включать одну или более операций из фильтрации, дистилляции, экстракции, концентрирования, фиксации, инактивации интерферирующих веществ и т.п.

Термин "контрольный образец" означает биологический образец, который, как известно или как подозревают, не содержит области, пораженные вызванным тау заболеванием, или который по меньшей мере, как известно или как подозревают, не содержит пораженные заболеванием области данного типа. Контрольные образцы можно получить от индивидуумов, не страдающих от вызванного тау заболевания. В качестве альтернативы, контрольные образцы можно получить от пациентов, страдающих от вызванного тау заболевания. Такие образцы можно получить одновременно с биологическим образцом, кото-

рый, как считают, содержит вызванное тау заболевание, или в другой раз. Биологический образец и контрольный образец можно получить из одной ткани. Предпочтительно, контрольные образцы состоят из по существу или полностью нормальных, здоровых областей, и их можно применять при сравнении с биологическим образцом, который, как считают, содержит области, пораженные вызванным тау заболеванием. Предпочтительно, ткань в контрольном образце относится к тому же типу, что и ткань в биологическом образце. Предпочтительно, пораженные вызванным тау заболеванием клетки, которые, как считают, находятся в биологическом образце, возникают из того же типа клеток (например, нейронов или глии), что и тип клеток в контрольном образце.

Термин "заболевание" означает любое аномальное состояние, которое нарушает физиологическую функцию. Термин используется в широком смысле, чтобы охватить любое нарушение, нездоровье, аномалию, патологию, болезнь, состояние или синдром, при котором нарушена физиологическая функция, вне зависимости от природы этиологии.

Термин "симптом" относится к субъективному проявлению заболевания, такому как измененная походка, воспринимаемому субъектом. "Признак" относится к объективному проявлению заболевания, наблюдаемому врачом.

Термин "положительный ответ на лечение" означает более благоприятный ответ у индивидуального пациента или средний ответ в популяции пациентов по сравнению со средним ответом в контрольной популяции, не получающей лечение.

С целью классификации аминокислотных замен на консервативные или неконсервативные аминокислоты сгруппированы следующим образом: группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; группа III (кислые боковые цепи): asp, glu; группа IV (основные боковые цепи): asn, gin, his, lys, arg; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): gly, pro; и группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe. Консервативные замены включают замены между аминокислотами одного класса. Неконсервативные замены представляют собой замены аминокислот одного класса на аминокислоты другого класса.

Процент идентичности последовательностей определяют с помощью последовательностей антител, максимально выровненных с использованием системы нумерации Кэбота. После выравнивания, если область представляющего интерес антитела (например, полную зрелую переменную область тяжелой или легкой цепи) сравнивают с той же областью эталонного антитела, процент идентичности последовательностей между областями представляющего интерес и эталонного антитела представляет собой количество положений, занятых одинаковыми аминокислотами, в областях как представляющего интерес, так и эталонного антитела, разделенное на общее количество выровненных положений двух областей, без подсчета разрывов, умноженное на 100 для преобразования в проценты.

Композиции или способы, "содержащие" или "включающие" один или более указанных элементов, могут содержать или включать другие элементы, конкретно не указанные. Например, композиция, которая "содержит" или "включает" антитело, может содержать антитело само по себе или в комбинации с другими компонентами. Когда описание относится к признаку, содержащему определенные элементы, альтернативное описание следует понимать как относящееся к признаку, состоящему по существу из указанных элементов или состоящему из них.

Указание диапазона значений включает все целые значения внутри или в пределах указанного диапазона и все поддиапазоны, определенные целыми значениями внутри диапазона

Если обратное не является очевидным из контекста, термин "приблизительно" охватывает несущественные вариации, такие как значения в пределах стандартной погрешности (например, СОС - стандартной ошибки среднего) от установленной величины.

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

Формы единственного числа включают упоминания объектов во множественном числе, если контекст однозначно не диктует обратное. Например, термин "соединение" или "по меньшей мере одно соединение" может включать множество соединений, в том числе их смеси.

Подробное описание изобретения

I. Общая часть.

В настоящем изобретении предложены антитела, которые связываются с тау. Некоторые антитела специфично связываются с эпитопом или эпитопами в области связывания микротрубочек (MTBR) тау человека, определенной приблизительно остатками 244-372 в SEQ ID NO: 1. Поскольку область MTBR содержит повторы последовательности, одно антитело может связываться с несколькими повторяющимися сайтами в этой области. Некоторые антитела специфично связываются с эпитопом KXXSXXNX(K/H)N (SEQ ID NO: 191). Некоторые антитела связываются в пределах остатков 199-213 и/или 262-276 SEQ ID NO: 3 (соответствующих остаткам 257-271 или 320-334, соответственно, в SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела связываются в пределах остатков 259-268 и/или 290-299 и/или 321-330 и/или 353-362 в SEQ ID NO: 1. В некоторых антителах связывание с областью MTBR 4 по остаткам 353-362 слабее, чем связывание с MTBR 1, 2 и 3. Некоторые антитела связываются с тау вне зависимости от статуса фосфорилирования. Некоторые антитела согласно настоящему изобретению выступают для ингибирования или отсрочивания связанных с тау патологий и связанных ухудшений симптомов. Несмотря на

то, что для реализации настоящего изобретения на практике понимание механизма не является необходимым, снижение токсичности может возникнуть в результате индуцированного антителом фагоцитоза тау, ингибирования меж-или внутримолекулярной агрегации тау или связывания с другими молекулами, посредством стабилизации нетоксичной конформации, посредством ингибирования межклеточной или внутриклеточной передачи патогенной формы тау, посредством блокады фосфорилирования тау, посредством предотвращения связывания тау с клетками или посредством индукции протеолитического расщепления тау, помимо других механизмов. Антитела согласно настоящему изобретению или средства, которые индуцируют такие антитела, можно применять в способах лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера и других заболеваний, связанных с тау.

II. Молекулы-мишени.

Если из контекста не очевидно обратное, указание на тау означает природную форму тау человека, включая все изоформы, вне зависимости от того, присутствует ли посттрансляционная модификация (например, фосфорилирование, гликирование или ацетилирование). Существует шесть основных изоформ (сплайс-вариантов) тау, образующихся в головном мозге человека. Самый длинный из данных вариантов содержит 441 аминокислоту, и в нем отщеплен начальный остаток met. Остатки нумеруют в соответствии с изоформой 441. Таким образом, например, упоминание фосфорилирования в положении 404 означает положение 404 изоформы 441 или соответствующее положение любой другой изоформы при максимальном выравнивании с изоформой 441. Аминокислотные последовательности изоформ и номера базы данных Swiss-Prot указаны ниже.

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

```

10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGETD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
70      80      90     100     110     120
SETSDAKSTP TAFEDVTAPIV DEGAPGKQAA AQPHTRTIPEG TTAFFAGTGD TPSLEDFRAAG
130     140     150     160     170     180
HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPF GQKQANATR IPAKTPAPK
190     200     210     220     230     240
TTPSSGSEPPK SGDRSGYSSEF GSPGTPGSRG RTPSLPTPPT REPKKVAVVF TPPKSPSSAK
250     260     270     280     290     300
SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
310     320     330     340     350     360
PGGGSVQIVY KPVVLSKVTG KCGSLGNTHH KPGGGQVEVK SEKLDLDFKDRV QSKTGSIDNT
370     380     390     400     410     420
THVPGGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSTGSDIMV
430     440
DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

```

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

```

10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGETD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
70      80      90     100     110     120
SETSDAKSTP TAEAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT
130     140     150     160     170     180
KIATPRGAAP PGQKQANAT RIPA KTPSSGSEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
190     200     210     220     230     240
SRTPSLPTPP TREPKKAVV RTTPKSPSSA KSRLQTAPVF MPDLKNVRSK IGSTENLKHQ
250     260     270     280     290     300
PGGGKVQIIN KLDLSNVQS KCGSKDNKIH VPGGGSVQIV YKPVVLSKVT SKCGSLGNTH
310     320     330     340     350     360
HKPGGGQVEV KSEKLDLDFKDR VQSKIGSLEN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG
370     380     390     400     410
AEIVYKSEVV SGDTSPRHLS NVSSTGSDIM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

```

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

```

10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGETD AGLKAEAGI GDTPSLEDEA
70      80      90     100     110     120
AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKQANA TRTPAKTPPA
130     140     150     160     170     180
PKTPSSGSEF PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS
190     200     210     220     230     240
AKSRLQTAPV EMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ SKCGSKDNK
250     260     270     280     290     300
HVPGGGSVQI VYKPVVLSKV TSKCGSLGNI HHPGGGQVE VKSEKLDLDFKDRVQSKIGSLD
310     320     330     340     350     360
NITHVPGGGN KKIETHKLTFR ENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSPRHLS NVSSTGSDIM
370     380
MVDSPQLATL ADEVASLAK QGL

```

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTTEIPGG	TTAAEEAGIGD	TFSLEDEAAG
130	140	150	160	170	180
HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKQGANATR	IPAKTTPPAFK
190	200	210	220	230	240
TPPSSGEPFK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSRG	RTPSLPTPPT	RFPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
250	260	270	280	290	300
SRLQTAPVPM	FDLKNVSKKI	GSTENLKHQP	GGGKVQIVYK	PVDLSKVTSK	CGSLGNIHHK
310	320	330	340	350	360
PGGGQVEVKS	EKLDFKDRVQ	SKIGSLDNIT	HVPGGGNKKI	ETHKLTFRFN	AKAKTDHGAE
370	380	390	400	410	
IVYKSPVVS	DTSPRHLSNV	SSTGSDMVD	SPQLATLADP	VSASLAKQGL	

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAAEEAGIGD	DTPSLEDEAA	GHVTQARMVS	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT
130	140	150	160	170	180
KIATPRGAAP	PGQKQANAT	RIPAKTTPPAF	KTPSSGEPFK	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
190	200	210	220	230	240
SRTPSLPTFP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVF	MPDLKNVSKK	IGSTENLKHQ
250	260	270	280	290	300
PGGGKVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDKDRVQ	QSKIGSLDNI
310	320	330	340	350	360
THVPGGGNKK	IETHKLTFRF	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN	VSTGSDMVD
370	380				
ESPQLATLAD	EVASLAKQGL				

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEEAGI	GTPSLEDEA
70	80	90	100	110	120
AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKQANA	TRIPAKTPEA
130	140	150	160	170	180
PKTPSSGEPF	PKSGDRSGYS	SFGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV	VRTTPKSPSS
190	200	210	220	230	240
AKSRLQTAPV	FMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQIV	YKPVVDLSKVT	SKCGSIGNIH
250	260	270	280	290	300
HKPGCCQVEV	KSEKLDKDR	VQSKIGSLDN	ITHVPGCCNK	KIETHKLTFR	ENAKAKTDHG
310	320	330	340	350	
AEIVYKSPVV	SGDTSPRHLS	NVSTGSDMVD	VDSPQLATLA	DEVASLAKQ	CL

Указание на тау включает известные природные вариации, приблизительно 30 из которых перечислены в базе данных Swiss-Prot, и их пермутации, а также мутации, связанные с патологиями тау, такими как деменция, болезнь Пика, надъядерный паралич и т.д. (см., например, базу данных Swiss-Prot и публикацию Poorkaj, et al., Ann Neurol. 43:815-825 (1998)). Некоторые примеры мутаций тау, пронумерованных согласно изоформе 441, представляют собой мутацию лизина на треонин в остатке аминокислоты 257 (K257T), мутацию изолейцина на валин в положении аминокислоты 260 (I260V); мутацию глицина на валин в положении аминокислоты 272 (G272V); мутацию аспарагина на лизин в положении аминокислоты 279 (N279K); мутацию аспарагина на гистидин в положении аминокислоты 296 (N296H); мутацию пролина на серин в положении аминокислоты 301 (P301S); мутацию пролина на лейцин в положении аминокислоты 301 (P301L); мутацию глицина на валин в положении аминокислоты 303 (G303V); мутацию серина на аспарагин в положении 305 (S305N); мутацию глицина на серин в положении аминокислоты 335 (G335S); мутацию валина на метионин в положении 337 (V337M); мутацию глутаминовой кислоты на валин в положении 342 (E342V); мутацию лизина на изолейцин в положении аминокислоты 369 (K369I); мутацию глицина на аргинин в положении аминокислоты 389 (G389R); и мутацию аргинина на триптофан в положении аминокислоты 406 (R406W).

Тау может являться фосфорилированным по одному или нескольким остаткам аминокислот, включая тирозин в положениях аминокислоты 18, 29, 97, 310 и 394, серин в положениях аминокислоты 184, 185, 198, 199, 202, 208, 214, 235, 237, 238, 262, 293, 324, 356, 396, 400, 404, 409, 412, 413 и 422; и треонин в положениях аминокислоты 175, 181, 205, 212, 217, 231 и 403. Если из контекста не очевидно обратное, указание на тау или их фрагменты включает природные аминокислотные последовательности человека, включая их изоформы, мутанты и аллельные варианты.

III. Антитела.

A. Специфичность связывания и функциональные свойства.

В настоящем изобретении предложены антитела, которые связываются с тау. Некоторые антитела

специфично связываются с эпитопом в пределах KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191). Некоторые антитела связываются с пептидом, содержащим, состоящим по существу или состоящим из остатков аминокислот 259-268 из 441 аминокислот тау-белка (SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела связываются с пептидом, содержащим, состоящим по существу или состоящим из остатков аминокислот 290-299 из 441 аминокислот тау-белка (SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела связываются с пептидом, содержащим, состоящим по существу или состоящим из остатков аминокислот 321-330 из 441 аминокислот тау-белка (SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела связываются с пептидом, содержащим, состоящим по существу или состоящим из остатков аминокислот 353-362 из 441 аминокислот тау-белка (SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела связываются с двумя, тремя или всеми четырьмя из этих пептидов. Некоторые антитела связываются с эпитопом в пределах остатков 199-213 из 383 аминокислот 4R0N тау-белка человека (SEQ ID NO: 3) (соответствующих остаткам 257-271 в SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела связываются с эпитопом в пределах остатков 262-276 из 383 аминокислот 4R0N тау-белка человека (SEQ ID NO: 3) (соответствующих остаткам 320-334 в SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела согласно настоящему изобретению специфично связываются с пептидом, состоящим из остатков 257-271 из 441 аминокислот тау-белка (SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела согласно настоящему изобретению специфично связываются с пептидом, состоящим из остатков 320-334 из 441 аминокислот тау-белка (SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела согласно настоящему изобретению специфично связываются с пептидом, состоящим из остатков 259-268 из 441 аминокислот тау-белка SEQ ID NO: 1, а именно KIGSTENLKH (SEQ ID NO: 188). Некоторые антитела согласно настоящему изобретению специфично связываются с пептидом, состоящим из остатков 290-299 из 441 аминокислот тау-белка SEQ ID NO: 1, а именно KCGSKDNIKH (SEQ ID NO: 192). Некоторые антитела согласно настоящему изобретению специфично связываются с пептидом, состоящим из остатков 321-330 из 441 аминокислот тау-белка SEQ ID NO: 1, а именно KCGSLGNIHH (SEQ ID NO: 193). Некоторые антитела согласно настоящему изобретению специфично связываются с пептидом, состоящим из остатков 353-362 из 441 аминокислот тау-белка SEQ ID NO: 1, а именно KIGSLDNITH (SEQ ID NO: 194). Некоторые антитела согласно настоящему изобретению специфично связываются с пептидом, состоящим из консенсусного мотива KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191). Некоторые антитела связываются с эпитопом, содержащим остатки 259, 262, 265, 267, 268, остатки 290, 293, 296, 298, 299, остатки 321, 324, 327, 329, 330 или остатки 353, 356, 359, 362 из 441 аминокислот тау-белка SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела связываются с тау вне зависимости от статуса фосфорилирования. Некоторые антитела связываются с эпитопом, не содержащим остаток, подлежащий фосфорилированию. Данные антитела можно получить посредством иммунизации полипептидом тау, очищенным из природного источника или экспрессированным рекомбинантным способом. Можно провести скрининг антител в отношении связывания с тау в нефосфорилированной форме, а также в форме, в которой один или более остатков, подающихся фосфорилированию, являются фосфорилированными. Такие антитела, предпочтительно, связываются с неотличимыми аффинностями или по меньшей мере в пределах 1,5-, 2- или 3-кратной величины аффинности с фосфорилированным тау по сравнению с нефосфорилированным тау (т.е. являются "панспецифичными"). 3D6 представляет собой пример панспецифичного моноклонального антитела. В настоящем изобретении также предложены антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и любое из вышеупомянутых антител, таким как, например, эпитоп 3D6. Также включены антитела, конкурирующие за связывание с тау с любым из вышеупомянутых антител, такие как, например, конкурирующие с 3D6.

Вышеупомянутые антитела могут быть получены *de novo* путем иммунизации пептидом, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 199-213 или 262-276 в SEQ ID NO: 3 (соответствующих остаткам 257-271 или 320-334 соответственно, в SEQ ID NO: 1), или путем иммунизации пептидом, состоящим по существу или состоящим из остатков 259-268, 290-299, 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1, или путем иммунизации полноразмерным полипептидом тау или его фрагментом, содержащим такие остатки, и путем скрининга на специфическое связывание с пептидом, включающим такие остатки. Такие пептиды предпочтительно присоединены к молекуле гетерологичного конъюгата, которая помогает вызвать ответ образования антител против пептида. Присоединение может быть прямым или через спейсерный пептид или аминокислоту. Цистеин используется в качестве спейсерной аминокислоты, поскольку его свободная группа SH облегчает прикрепление молекулы-носителя. Также можно использовать полиглициновый линкер (например, 2-6 остатков глицина) с остатком цистеина между остатками глицина и пептидом или без него. Молекула-носитель служит для обеспечения Т-клеточного эпитопа, который помогает вызвать ответ образования антител против пептида. Обычно используются несколько носителей, в частности гемоглобин фисуреллы (KLH), яичный альбумин и бычий сывороточный альбумин (BSA). Пептидные спейсеры могут быть добавлены к пептидному иммуногену как часть твердофазного пептидного синтеза. Носители обычно добавляют путем химического сшивания. Некоторые примеры химических сшивающих агентов, которые можно использовать, включают Кросс-N-малеимидо-6-аминокапроиловый сложный эфир или м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (MBS) (см, например, Harlow, E. et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1988; Sinigaglia et al., *Nature*, 336:778-780 (1988); Chiciz et al., *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer et al., *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. et al., *Immunogenetics*, 39:230-

242 (1994); WO 98/23635; и Southwood et al., J. Immunology, 160:3363-3373 (1998)). Носитель и спейсер, если они присутствуют, могут быть присоединены к любому концу иммуногена.

Пептид с необязательным спейсером и носителем можно использовать для иммунизации лабораторных животных или В-клеток, как более подробно описано ниже. Супернатанты гибридом могут быть протестированы на способность связывать один или более пептидов, включающие, состоящие по существу из или состоящие из остатков 199-213 или 262-276 в SEQ ID NO: 3 (соответствующих остаткам 257-271 или 320-334, соответственно, в SEQ ID NO: 1) или включающие, состоящие по существу или состоящие из остатков 259-268, 290-299, 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1, и/или фосфорилированные и нефосфорилированные формы тау, такой как, например, полноразмерная изоформа тау с положением 404 в фосфорилированной форме. Пептид может быть присоединен к носителю или другой метке для облегчения скринингового анализа. В этом случае носитель или метка предпочтительно отличается от комбинации спейсера и молекулы носителя, используемой для иммунизации для устранения антител, специфичных для спейсера или носителя, а не тау-пептида. Можно применять любую из изоформ тау.

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, связывающимся с эпитопами тау-белка. Антитело, обозначенное 3D6, является одним из таких типичных антител мыши. Если из контекста не очевидно обратное, упоминание о 3D6 следует понимать как упоминание о любой из мышинной, химерной, венированной и гуманизированной формы данного антитела. Антитело было депонировано как [номер депонирования]. Это антитело специфично связывается с эпитопом KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191). Это антитело специфично связывается с аминокислотными остатками 199-213 и/или 262-276 из 383 аминокислот 4R0N тау-белка человека (SEQ ID NO: 3) (соответствует аминокислотным остаткам 257-271 и/или 320-334, соответственно, в SEQ ID NO: 1). Это антитело специфично связывается с аминокислотными остатками 259-268 или 290-299 или 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1 и комбинациями любых из 2, 3 или всех четырех. Данное антитело также характеризуется способностью связываться как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным тау, как с непатологической, так и с патологической формами и конформациями тау, и с неправильно свернутыми/агрегированными формами тау. Антитело, обозначенное 6A10, является одним таким примером антитела мыши. Если из контекста не очевидно обратное, упоминание о 6A10 следует понимать как упоминание о любой из формы мыши, химерной, венированной и гуманизированной формы данного антитела. CDR тяжелой цепи 6A10 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа обозначены SEQ ID NO: 67, 68 и 69 соответственно, и CDR легкой цепи 6A10 согласно Кэботу обозначены SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно. 6A10 мыши характеризуется идентичностью последовательности VH 82,1% и идентичностью последовательности VL 100% с цепью VH и цепью VL, соответственно, 3D6 мыши.

Некоторые антитела согласно настоящему изобретению связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и антитело, обозначенное 3D6. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей данного антитела обозначены SEQ ID NO: 7 и 11 соответственно. Другие антитела, обладающие такой специфичностью связывания, могут быть получены путем иммунизации мышей тау или его части, включающими, по существу состоящими из или состоящими из желаемого эпитопа (например, 199-213 и/или 262-276 в SEQ ID NO: 3, что соответствует остаткам 257-271 и/или 320-334, соответственно, в SEQ ID NO: 1; или например, 259-268 или 290-299 или 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1, любой комбинации из 2,3 или всех 4 из них) и скрининга полученных антител на связывание с тау, необязательно конкурирующим с антителом, имеющим переменные области мышинного 3D6 (IgG1 каппа). Фрагменты тау, включая желаемый эпитоп, могут быть связаны с носителем, который помогает вызвать ответ образования антител к фрагменту, и/или могут быть объединены с адьювантом, помогающим вызвать такой ответ. Такие антитела можно подвергнуть скринингу на предмет дифференциального связывания с тау или его фрагментом по сравнению с мутантами по указанным остаткам. Скрининг против таких мутантов более точно определяет специфичность связывания, что позволяет идентифицировать антитела, связывание которых ингибируется мутагенезом определенных остатков и которые, вероятно, обладают функциональными свойствами других типичных антител. Мутации могут представлять собой систематическую замену на аланин (или серин, если аланин уже присутствует) по одному остатку одновременно или через более широкие интервалы, по всей мишени или по ее участку, в котором, как известно, находится эпитоп. Если один и тот же набор мутаций значительно снижает связывание двух антител, два антитела связывают один и тот же эпитоп.

Антитела, обладающие специфичностью связывания выбранного мышинного антитела (например, 3D6), также могут быть получены с использованием варианта способа фагового дисплея. См. Winter, WO 92/20791. Этот способ особенно подходит для получения человеческих антител. В этом способе в качестве исходного материала используют переменную область тяжелой или легкой цепи выбранного мышинного антитела. Если, например, в качестве исходного материала выбрана переменная область легкой цепи, создают фаговую библиотеку, члены которой отображают одну и ту же переменную область легкой цепи (т.е. исходный материал мыши) и другую переменную область тяжелой цепи. Переменные области тяжелой цепи можно, например, получить из библиотеки перегруппированных переменных областей тяжелой цепи человека. Выбирают фаг, демонстрирующий сильное специфическое связывание с тау или его фрагментом (например, по меньшей мере 10^8 и предпочтительно по меньшей мере 10^9 M⁻¹).

Вариабельная область тяжелой цепи этого фага затем служит исходным материалом для конструирования дополнительной фаговой библиотеки. В этой библиотеке каждый фаг отображает одну и ту же вариабельную область тяжелой цепи (т.е. область, идентифицированную из первой библиотеки дисплея) и другую вариабельную область легкой цепи. Вариабельные области легкой цепи можно получить, например, из библиотеки перегруппированных областей вариабельной легкой цепи человека. Опять же, выбирают фаг, демонстрирующий сильное специфическое связывание с тау или его фрагментом. Полученные антитела обычно обладают такой же или сходной эпитопной специфичностью, что и мышинный исходный материал.

CDR тяжелой цепи 3D6 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа обозначены SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, и CDR легкой цепи 3D6 согласно Кэботу обозначены SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно.

В табл. 2 представлены CDR 3D6 согласно определениям Кэбота, Чотиа, сводному определению Кэбота и Чотиа (также называют в настоящем документе "сводное определение Кэбота/Чотиа"), AbM и контактному определению.

Таблица 2
CDR 3D6 согласно определению Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота, AbM и контактному определению

Петля	Кэбот	Чотиа	Сводное определение Чотиа и Кэбота	AbM	Контактное определение
L1	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L30--L36 SEQ ID NO:36
L2	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L46--L55 SEQ ID NO:37
L3	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L96 SEQ ID NO:38
H1	H31--H35B SEQ ID NO:32	H26--H32 SEQ ID NO:33	H26--H35B SEQ ID NO:8	H26--H35B SEQ ID NO:8	H30--H35B SEQ ID NO:39
H2	H50--H65 SEQ ID NO:9	H52--H56 SEQ ID NO:34	H50--H65 SEQ ID NO:9	H50--H58 SEQ ID NO:35	H47--H58 SEQ ID NO:40
H3	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H93--H101 SEQ ID NO:41

Другие антитела можно получить посредством мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи типичного антитела, такого как 3D6.

Моноклональные антитела, которые по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны 3D6 по аминокислотной последовательности зрелых вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепей и сохраняют их функциональные свойства, и/или которые отличаются от соответствующего антитела небольшим количеством функционально несущественных замен аминокислот (например, консервативных замен), делеций или вставок, также включены в настоящее изобретение. Также включены моноклональные антитела, содержащие по меньшей мере один или все шесть CDR согласно любому общепринятому определению, но, предпочтительно, согласно Кэботу, которые на 90%, 95%, 99% или 100% идентичны соответствующим CDR 3D6.

В настоящем изобретении также предложены антитела, содержащие некоторые или все (например,

3, 4, 5 и 6) CDR, полученные полностью или по существу из 3D6. Такие антитела могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит по меньшей мере два, но обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из вариабельной области тяжелой цепи 3D6, и/или вариабельную область легкой цепи, которая содержит по меньшей мере два, но обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из вариабельной области легкой цепи 3D6. Антитела могут содержать как тяжелую, так и легкую цепи. CDR по существу получен из соответствующего CDR 3D6, когда он содержит не более 4, 3, 2 или 1 замен, вставок или делеций, за исключением того, что CDR-H2 (при определении согласно Кэботу) может содержать не более 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен, вставок или делеций. Такие антитела могут характеризоваться идентичностью по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с 3D6 аминокислотной последовательности зрелых вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепей и сохранять их функциональные свойства, и/или могут отличаться от 3D6 небольшим количеством функционально несущественных замен аминокислот (например, консервативных замен), делеций или вставок.

Некоторые антитела, идентифицированные в таких анализах, могут связываться с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными, фосфорилированными или нефосфорилированными формами тау или иными формами. Аналогично, некоторые антитела являются иммунологически реактивными в отношении непатологической и патологической формы и конформаций тау.

V. Антитела, отличные от антител человека.

Получение других антител, отличных от антител человека, например, антител мышей, морских свинок, приматов, кроликов или крыс, против тау-белка или его фрагмента (например, остатков аминокислот 199-213 или 262-276 в SEQ ID NO: 3, соответствующих аминокислотным остаткам 257-271 или 320-334, соответственно, в SEQ ID NO: 1; или аминокислотным остаткам 259-268 или 290-299 или 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1) можно осуществлять, например, путем иммунизации животного тау или его фрагментом. См. Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (включено посредством ссылки для всех целей). Такой иммуноген можно получить из природного источника, путем синтеза пептидов или путем рекомбинантной экспрессии. Необязательно, иммуноген можно вводить слитым или в форме полученного иным образом комплекса с белком-носителем. Необязательно, иммуноген можно вводить с адьювантом. Можно использовать несколько типов адьюванта, как описано ниже. Для иммунизации лабораторных животных предпочтительно использовать полный адьювант Фрейнда с последующим неполным адьювантом. Кроликов или морских свинок обычно используют для получения поликлональных антител. Мышей обычно используют для получения моноклональных антител. Антитела подвергают скринингу на предмет специфического связывания с тау или эпитопом внутри тау (например, эпитопом, содержащим один или более остатков аминокислот 199-213 или 262-276 в SEQ ID NO: 3; соответствующих аминокислотным остаткам 257-271 или 320-334, соответственно, в SEQ ID NO: 1 или эпитопом, содержащим один или более остатков аминокислот 259-268 или 290-299, 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1). Такой скрининг может быть проведен путем определения связывания антитела с набором вариантов тау, таких как варианты тау, содержащие остатки аминокислот 199-213 или 262-276 в SEQ ID NO: 3 (соответствующие аминокислотным остаткам 257-271 или 320-334, соответственно, в SEQ ID NO: 1) или вариантов тау, содержащих остатки аминокислот 259-268, 290-299 или 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1, или мутации в этих остатках, и путем определения, какие варианты тау связываются с антителом. Связывание можно оценить, например, с помощью вестерн-блоттинга, FACS или ELISA.

C. Гуманизированные антитела.

Гуманизированное антитело представляет собой генно-инженерное антитело, в котором CDR от "донорного" антитела, отличного от антитела человека, переносят в "акцепторные" последовательности антитела человека (см., например, публикации Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US 6407213; Adair, US 5859205; и Foote, US 6881557). Последовательности акцепторного антитела могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, объединение таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антитела человека или последовательность зародышевой области. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, содержащее по меньшей мере три, четыре, пять или все CDR, полученные полностью или по существу из донорного антитела, и последовательности каркасного участка вариабельной области и константные области, в случае присутствия, полученные полностью или по существу из последовательностей антитела человека. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь содержит по меньшей мере один, два и обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из тяжелой цепи донорного антитела, и последовательность каркасного участка вариабельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, в случае присутствия, полученные по существу из последовательностей каркасного участка вариабельной области и константной области тяжелой цепи человека. Аналогично, гуманизированная легкая цепь содержит по меньшей мере один, два и обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела, и последовательность каркасного участка вариабельной области легкой цепи и константную область легкой цепи, в случае присутствия, полученные по существу из последовательностей каркасного участка вариабельной области и константной области легкой цепи человека. В отличие от нанотел и dAb, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе получены по существу

из соответствующего CDR в антителе, отличном от антитела человека, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (согласно любому общепринятому определению, но, предпочтительно, определенных согласно Кэботу) являются идентичными между соответствующими CDR. Последовательности каркасного участка вариабельной области цепи антитела или константная область цепи антитела получены по существу из последовательности каркасного участка вариабельной области человека или константной области человека, соответственно, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных согласно Кэботу, являются идентичными. Для классификации в качестве гуманизованного в соответствии с определением гуманизованных антител согласно международным непатентованным наименованиям (МНН) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) от 2014 г., антитело должно характеризоваться идентичностью по меньшей мере 85% с последовательностями антитела зародышевой линии человека (т.е. до соматической гипермутации). Смешанные антитела представляют собой антитела, в которых одна цепь антитела (например, тяжелая цепь) соответствует предельному значению, но другая цепь (например, легкая цепь) не соответствует предельному значению. Антитело классифицируют как химерное, если ни одна из цепей не соответствует предельному значению, даже если каркасные участки вариабельной области для обеих цепей были получены по существу от человека с некоторыми обратными мутациями мыши. См. публикацию Jones et al. (2016) The INNs and outs of antibody nonproprietary names, mAbs 8:1, 1-9, DOI: 10.1080/19420862.2015.1114320. См. также публикацию "WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)" (интернет) 2014. Доступна по адресу <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>, включена в настоящий документ посредством ссылки. Во избежание сомнений термин "гуманизованное" в настоящем документе не ограничен определением гуманизованных антител согласно МНН ВОЗ 2014 г. Некоторые из гуманизованных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности по меньшей мере 85% последовательностям зародышевой линии человека, и некоторые из гуманизованных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности менее 85% последовательностям зародышевой линии человека. Некоторые из тяжелых цепей гуманизованных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности от приблизительно 60% до 100% с последовательностями зародышевой линии человека, такие как, например, в диапазоне от приблизительно 60% до 69%, от 70% до 79%, от 80% до 84% или от 85% до 89%. Некоторые тяжелые цепи не дотягивают до определения согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются, например, идентичностью последовательности приблизительно 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81% или 82%, 83% или 84% с последовательностями зародышевой линии человека, тогда как другие тяжелые цепи соответствуют определению согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или большей идентичностью последовательности с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые из легких цепей гуманизованных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности от приблизительно 60% до 100% с последовательностями зародышевой линии человека, такими как, например, в диапазоне от приблизительно 80% до 84% или от 85% до 89%. Некоторые легкие цепи не дотягивают до определения согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются, например, идентичностью последовательности приблизительно 81%, 82%, 83% или 84% с последовательностями зародышевой линии человека, тогда как другие легкие цепи соответствуют определению согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или большей идентичностью последовательности с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые гуманизованные антитела, предложенные в настоящем документе, которые являются "химерными" в соответствии с определением согласно МНН ВОЗ 2014 г., содержат тяжелые цепи с идентичностью менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренные с легкими цепями, которые характеризуются идентичностью менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые гуманизованные антитела, предложенные в настоящем документе, являются "смешанными" в соответствии с определением согласно МНН ВОЗ 2014 г., например, содержат тяжелую цепь с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренную с легкой цепью, которая характеризуется идентичностью последовательности менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека, или наоборот. Некоторые гуманизованные антитела, предложенные в настоящем документе, соответствуют определению "гуманизованного" антитела согласно МНН ВОЗ 2014 г. и содержат тяжелую цепь с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренную с легкой цепью, которая характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека. Дополнительные гуманизованные антитела согласно настоящему изобретению соответствуют определению "смешанных" антител согласно МНН ВОЗ 2014 г.

Несмотря на то, что гуманизованные антитела часто содержат все шесть CDR (определенных согласно любому общепринятому определению, но, предпочтительно, согласно определению Кэбота) из антитела мыши, их также можно получить не со всеми CDR (например, по меньшей мере с 3, 4 или 5

CDR) из антитела мыши (например, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *J. of Mol. Biol.*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *J. Immunol.*, 164:1432-1441, 2000).

В некоторых антителах только часть CDR, а именно подгруппа остатков CDR, необходимых для связывания, обозначаемых SDR, необходимы для сохранения связывания в гуманизованном антителе. Остатки CDR, не осуществляющие контакт с антигеном и не относящиеся к SDR, можно идентифицировать на основании предшествующих исследований (например, остатки H60 - H65 в CDR H2 часто не являются необходимыми), из областей CDR согласно Кэботу, лежащих за пределами гипервариабельных петель Чотиа (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), методом молекулярного моделирования и/или эмпирически, или как описано в публикации Gonzales et al., *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. В таких гуманизованных антителах в положениях, в которых отсутствуют один или более донорных остатков CDR или в которых пропущен весь донорный CDR, аминокислота, занимающая положение, может представлять собой аминокислоту, занимающую соответствующее положение (согласно нумерации Кэбота) в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замен акцептора аминокислотами донора в CDR для включения отражает баланс конкурирующих соображений. Такие замены являются потенциально благоприятными для снижения количества аминокислот мыши в гуманизованном антителе и, как следствие, снижения потенциальной иммуногенности, и/или для соответствия определению "гуманизованного" антитела согласно МНН ВОЗ. Однако замены могут также вызывать изменения аффинности, и значительного снижения аффинности, предпочтительно, избегают. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замещения также можно выбрать эмпирически.

Последовательности акцепторного антитела человека можно необязательно выбрать среди множества известных последовательностей антитела человека для получения высокой степени идентичности последовательности (например, идентичности 65 - 85%) между каркасными участками вариабельной области акцепторной последовательности человека и соответствующими каркасными участками вариабельной области цепи донорного антитела.

Некоторые гуманизованные и химерные антитела обладают одинаковыми (в пределах экспериментальной ошибки) или улучшенными функциональными свойствами, например, аффинностью связывания с тау человека, ингибированием интернализации тау в нейроны, как описано в примерах, как и мышинные антитела, из которых они были получены. Например, некоторые гуманизованные и химерные антитела обладают аффинностью связывания в 3, 2 или 1 раз выше по сравнению с мышинным антителом, из которого они были получены, или аффинностью, неразличимой в пределах экспериментальной ошибки. Некоторые гуманизованные и химерные антитела ингибируют интернализацию тау в нейроны, как описано в примерах, в 3, 2 или 1 раз больше мышинного антитела, из которого они были получены, или ингибируют то же самое в пределах экспериментальной ошибки, что и мышинное антитело, из которого они были получены. Некоторые гуманизованные антитела демонстрируют пониженную иммуногенность, повышенную аффинность, повышенную термостабильность и/или улучшенную экспрессию по сравнению с ранее описанными гуманизованными формами антитела 3D6 (см. WO 2017/191560). hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 продемонстрировали улучшенную аффинность, о чем свидетельствует значение скорости ассоциации, скорости диссоциации и K_d по сравнению с исходным hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2. hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 продемонстрировал более высокую термостабильность и титр по сравнению с исходным hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2.

Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи представляет собой зрелую вариабельную область тяжелой цепи человека гуманизованного 48G7 Fab с учетным кодом PDB 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO: 75). Вариабельные домены 3D6 и 48G7 Fab также имеют одинаковую длину для петель CDR-H1, H2. Примером акцепторной последовательности тяжелой цепи является человеческая зрелая вариабельная область тяжелой цепи IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25). IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) имеет каноническую форму CDR-H1 и H2 мышинной тяжелой цепи 3D6. IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) принадлежит к подгруппе 1 тяжелой цепи человека. Примером акцепторной последовательности легкой цепи является зрелая вариабельная область легкой цепи человека с учетным кодом PDB человеческое антитело ARX71335 VL (SEQ ID NO: 82). Вариабельный легкий домен антитела 3D6 и ARX71335 также имеет одинаковую длину для петель CDR-L1, L2 и L3. Примером акцепторной последовательности легкой цепи является зрелая вариабельная область легкой цепи человека с IMGT# IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27). IMGT# IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) имеет те же канонические классы для CDR-L1, CDR-L2 и L3, что и мышинное 3D6. IMGT# IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) принадлежит к подгруппе 2 каппа человека.

Если выбраны более одной акцепторной последовательности антитела человека, можно применять объединение или гибрид данных акцепторов, и аминокислоты, используемые в различных положениях в гуманизованных вариабельных областях легкой цепи и тяжелой цепи, могут быть взяты из любой из используемых последовательностей акцепторного антитела человека. Например, зрелые вариабельные области тяжелой цепи человека IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) и с учетным кодом PDB # 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO: 75) применяли в качестве акцепторных последовательностей для гуманизации зрелой вариабельной области тяжелой цепи 3D6. Пример положений, в которых данные два акцептора

отличаются, включает положение H17 (Т или S). Гуманизированные версии вариабельной области тяжелой цепи 3D6 могут содержать любые аминокислоты в данном положении. Например, зрелые вариабельные области легкой цепи человека IMGT# IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) и PDB номер # ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO: 82) применяли в качестве акцепторных последовательностей для гуманизации зрелой вариабельной области легкой цепи 3D6. Примером положения, в котором эти два акцептора различаются, является положение L100 (Q или A). Гуманизированные версии вариабельной области легкой цепи 3D6 могут включать любую аминокислоту в этом положении.

Определенные аминокислоты из каркасных остатков вариабельной области человека можно выбрать для замещения на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных влияний осуществляют посредством моделирования, изучения характеристик аминокислот в конкретных расположениях или эмпирического наблюдения за эффектами замены или мутагенеза конкретных аминокислот.

Например, когда аминокислота отличается между каркасным остатком вариабельной области мыши и выбранным каркасным остатком вариабельной области человека, каркасную аминокислоту человека можно заменить эквивалентной каркасной аминокислотой из антитела мыши, когда обоснованно ожидают, что аминокислота:

- (1) нековалентно напрямую связывается с антигеном;
- (2) прилегает к участку CDR или в пределах CDR согласно определению Чотиа, но не Кэбота;
- (3) иным способом взаимодействует с участком CDR (например, находится в пределах приблизительно 6 Å от участка CDR) (например, что идентифицировано посредством моделирования легкой или тяжелой цепи на расшифрованной структуре гомологичной известной цепи иммуноглобулина); или
- (4) представляет собой остаток, участвующий в поверхности взаимодействия VL-VH.

Согласно варианту реализации гуманизированные последовательности получены с применением двухэтапного протокола ПЦР, который позволяет вводить несколько мутаций, делеций и вставок с применением сайт-направленного мутагенеза QuikChange [Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) *BioTechniques* 26:680-682].

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

Другие каркасные остатки, которые являются кандидатами для замены, представляют собой остатки, образующие потенциальный сайт гликозилирования. Еще одними кандидатами для замены являются акцепторные каркасные аминокислоты человека, которые являются необычными для иммуноглобулина человека в данном положении. Данные аминокислоты можно заменить аминокислотами из эквивалентного положения донорного антитела мыши или из эквивалентного положения более типичных иммуноглобулинов человека.

Другие каркасные остатки, которые являются кандидатами для замены, представляют собой N-концевые остатки глутамина (Q), которые можно заменить глутаминовой кислотой (E) для минимизации возможности конверсии пироглутамата [Y. Diana Liu, et al., 2011, *J. Biol. Chem.*, 286: 11211-11217]. Конверсия глутаминовой кислоты (E) в пироглутамат (pE) происходит более медленно, чем глутамина (Q). В связи с утратой первичного амина при конверсии глутамина в pE антитела становятся более кислыми. В результате неполной конверсии в антителе возникает гетерогенность, которую можно наблюдать в виде множества пиков с применением аналитических способов на основе заряда. Различия в гетерогенности могут свидетельствовать о недостаточном контроле процесса.

Иллюстративные гуманизированные антитела представляют собой гуманизированные формы 3D6 мыши, обозначенные Hu3D6.

Антитело 3D6 мыши содержит зрелые вариабельные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые содержат SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11 соответственно. В настоящем изобретении предложены гуманизированные формы мышинового антитела 3D6, включая 10 иллюстративных гуманизированных зрелых вариабельных областей тяжелой цепи

(hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76), hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77), hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78), hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79), hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80), hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91), hu3D6VHv1bA11 D60E (h3D6VHvb8, SEQ ID NO:146), hu3D6VHv1bA11 L82cV (SEQ ID NO:147) и hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9, SEQ ID NO:148))

и 56 иллюстративных гуманизированных зрелых вариабельных областей легкой цепи

(hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83), hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84), hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85), hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54N (SEQ ID NO:95), hu3D6VLv2 L54E (SEQ ID NO:96), hu3D6VLv2 L50E (SEQ ID NO:97), hu3D6VLv2 L54Q (SEQ ID NO:98), hu3D6VLv2 L50D (SEQ ID NO:99), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101), hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103), hu3D6VLv2 I48G (SEQ ID NO:104), hu3D6VLv2 I48D (SEQ ID NO:105), hu3D6VLv2 L47G (SEQ ID NO:106), hu3D6VLv2 Y49E (SEQ ID NO:107), hu3D6VLv2 L54V (SEQ ID NO:108), hu3D6VLv2 L54S (SEQ ID NO:109), hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L47N (SEQ ID NO:111), hu3D6VLv2 L47D (SEQ ID NO:112), hu3D6VLv2 L47E (SEQ ID NO:113), hu3D6VLv2 L47P (SEQ ID NO:114), hu3D6VLv2 L47T (SEQ ID NO:115), hu3D6VLv2 L47S (SEQ ID NO:116), hu3D6VLv2 L47A (SEQ ID NO:117), hu3D6VLv2 L50V (SEQ ID NO:118), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124), hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125), hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128), hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131), hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (SEQ ID NO:134), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (SEQ ID NO:135), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143) и hu3D6VLv2 G100Q (SEQ ID NO:144)).

На фиг. 2 и 3 показано выравнивание переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, соответственно, мышинных 3D6 и различных гуманизованных антител. На фиг. 9А и 9В показано выравнивание переменной области тяжелой цепи мышинного 3D6 с переменной областью тяжелой цепи различных гуманизованных антител. На фиг. 10А, 10В, 10С и 10D показано выравнивание переменной области легкой цепи hu3D6VLv2 с переменной областью легкой цепи различных гуманизованных антител.

По причинам, таким как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, представление собой сайта для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, представление собой необычного остатка для своего положения в последовательности переменной области человека и вследствие этого - потенциально иммуногенного, приобретение потенциала агрегации, и по другим причинам следующие 35 каркасных положений переменной области посчитали кандидатами для замены в 56 иллюстративных зрелых переменных областях легкой цепи человека и 10 иллюстративных зрелых переменных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примерах:

L7 (T7S), L10 (T10S), L15 (I15L), L17 (Q17E), L37 (L37Q), L45 (K45R), L47 (L47G, L47N, L47D, L47E, L47P, L47T, L47S или L47A), L48 (I48G или I48D), L49 (Y49E), L83 (L83V), L86 (H86Y), L100 (A100Q), L106 (L106I), H1 (Q1E), H5 (Q5V), H11 (L11V), H17 (S17T), H20 (L20I), H23 (T23K), H38 (K38R), H42 (E42G), H43 (Q43K), H66 (K66R), H67 (A67V), H75 (S75T), H76 (N76D), H80 (L80M), H81 (Q81E), H82c (L82cV), H83 (T83R), H91 (Y91F), H93 (A93S), H94 (S94T), H108 (T108L) и H109 (L109V).

Следующие 9 CDR положений переменной области посчитали кандидатами для замены в 56 иллюстративных зрелых переменных областях легкой цепи человека и 10 иллюстративных зрелых переменных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примерах:

L24 (K24R), L50 (L50E, L50D, L50G или L50V), L52 (S52G), L54 (L54D, L54G, L54N, L54E, L54Q, L54K, L54R, L54T, L54V или L54S), H28 (N28T), H54 (N54D), H56 (D56E), H58 (V58I) и H60 (D60E).

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах CDR-H2 согласно Кэботу имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах CDR-H2 согласно Кэботу имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 149. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах Согласно сводному определению Кэбота-Чотиа CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86, и CDR-H2 согласно Кэботу имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах согласно сводному определению Кэбота-Чотиа CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86, и CDR-H2 согласно Кэботу имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 88. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах согласно сводному определению Кэбота-Чотиа CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86, и CDR-H2 согласно Кэботу имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 92. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах CDR-L1 согласно Кэботу имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 89. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах CDR-L2 согласно Кэботу содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 150-175.

Здесь, как и в другом месте, упомянутый первым остаток представляет собой остаток гуманизованного антитела, образованный посредством переноса CDR согласно Кэботу или CDR согласно сводному определению Чотиа-Кэбота в случае CDR-H1 в акцепторный каркасный участок человека, и упомянутый вторым остаток представляет собой остаток, рассматриваемый для замены такого остатка. Таким образом, в пределах каркасных участков варибельной области упомянутый первым остаток представляет собой остаток человека, а в пределах CDR упомянутый первым остаток представляет собой остаток мыши.

Иллюстративные антитела включают любые пермутации или комбинации иллюстративных зрелых варибельных областей тяжелой и легкой цепей

				VHvb1/VLvb1,
VHvb1/VLvb2,	VHvb1/VLvb3,	VHvb2/VLvb1,	VHvb2/VLvb2,	VHvb2/VLvb3,
VHvb3/VLvb1,	VHvb3/VLvb2,	VHvb3/VLvb3,	VHvb4/VLvb1,	VHvb4/VLvb2,
VHvb4/VLvb3,	VHvb5/VLvb1,	VHvb5/VLvb2,	VHvb5/VLvb3,	VHvb6/VLvb1,
VHvb6/VLvb2,	VHvb6/VLvb3,	VHvb7/VLvb1,	VHvb7/VLvb2,	VHvb7/VLvb3.

Иллюстративные антитела включают любые пермутации или комбинации иллюстративных зрелых варибельных областей тяжелых цепей

hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76), hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77), hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78), hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79), hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80), hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91), hu3D6VHv1bA11 D60E (h3D6VHvb8, SEQ ID NO:146), hu3D6VHv1bA11 L82cV (SEQ ID NO:147) и hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9, SEQ ID NO:148)

с любыми из следующих варибельных областей легкой цепи гуманизованного 3D6VL:

hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83), hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84), hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85), hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54N (SEQ ID NO:95), hu3D6VLv2 L54E (SEQ ID NO:96), hu3D6VLv2 L50E (SEQ ID NO:97), hu3D6VLv2 L54Q (SEQ ID NO:98), hu3D6VLv2 L50D (SEQ ID NO:99), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101), hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103), hu3D6VLv2 I48G (SEQ ID NO:104), hu3D6VLv2 I48D (SEQ ID NO:105), hu3D6VLv2 L47G (SEQ ID NO:106), hu3D6VLv2 Y49E (SEQ ID NO:107), hu3D6VLv2 L54V (SEQ ID NO:108), hu3D6VLv2 L54S (SEQ ID NO:109), hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L47N (SEQ ID NO:111), hu3D6VLv2 L47D (SEQ ID NO:112), hu3D6VLv2 L47E (SEQ ID NO:113), hu3D6VLv2 L47P (SEQ ID NO:114), hu3D6VLv2 L47T (SEQ ID NO:115), hu3D6VLv2 L47S (SEQ ID NO:116), hu3D6VLv2 L47A (SEQ ID NO:117), hu3D6VLv2 L50V (SEQ ID NO:118), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124), hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125), hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128), hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131), hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (SEQ ID NO:134), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (SEQ ID NO:135), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143) и hu3D6VLv2 G100Q (SEQ ID NO:144).

Иллюстративные антитела включают любые пермутации или комбинации иллюстративных зрелых переменных областей тяжелых цепей

hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76), hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77), hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78), hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79), hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80), hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91), hu3D6VHv1bA11 D60E (h3D6VHvb8, SEQ ID NO:146), hu3D6VHv1bA11 L82cV (SEQ ID NO:147) и hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9, SEQ ID NO:148)

с любыми из следующих переменных областей легкой цепи гуманизованного 3D6VL:

hu3D6VLv1 (SEQ ID NO:20), hu3D6VLv2 (SEQ ID NO:21), hu3D6VLv3 (SEQ ID NO:22) и hu3D6VLv4 (SEQ ID NO:22).

Иллюстративные антитела включают любые пермутации или комбинации иллюстративных зрелых переменных областей легких цепей

hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83), hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84), hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85), hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54N (SEQ ID NO:95), hu3D6VLv2 L54E (SEQ ID NO:96), hu3D6VLv2 L50E (SEQ ID NO:97), hu3D6VLv2 L54Q (SEQ ID NO:98), hu3D6VLv2 L50D (SEQ ID NO:99), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101), hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103), hu3D6VLv2 I48G (SEQ ID NO:104), hu3D6VLv2 I48D (SEQ ID NO:105), hu3D6VLv2 L47G (SEQ ID NO:106), hu3D6VLv2 Y49E (SEQ ID NO:107), hu3D6VLv2 L54V (SEQ ID NO:108), hu3D6VLv2 L54S (SEQ ID NO:109), hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L47N (SEQ ID NO:111), hu3D6VLv2 L47D (SEQ ID NO:112), hu3D6VLv2 L47E (SEQ ID NO:113), hu3D6VLv2 L47P (SEQ ID NO:114), hu3D6VLv2 L47T (SEQ ID NO:115), hu3D6VLv2 L47S (SEQ ID NO:116), hu3D6VLv2 L47A (SEQ ID NO:117), hu3D6VLv2 L50V (SEQ ID NO:118), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124), hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125), hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128), hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131), hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (SEQ ID NO:134), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (SEQ ID NO:135), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143) и hu3D6VLv2 G100Q (SEQ ID NO:144)

с любыми из следующих переменных областей тяжелой цепи гуманизованного 3D6:

hu3D6VHv1 (SEQ ID NO:15); hu3D6VHv2 (SEQ ID NO:16); hu3D6VHv1b (SEQ ID NO:17); hu3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO:18); hu3D6VHv5 (SEQ ID NO:19); hu3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO:46); hu3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO:47); hu3D6VHv1c (SEQ ID NO:48); hu3D6VHv1d (SEQ ID NO:49); hu3D6VHv1e (SEQ ID NO:50); hu3D6VHv1f (SEQ ID NO:51); hu3D6VHv3 (SEQ ID NO:52); hu3D6VHv3b (SEQ ID NO:53); hu3D6VHv3c (SEQ ID NO:54); hu3D6VHv4 (SEQ ID NO:55); hu3D6VHv4b (SEQ ID NO:56); и hu3D6VHv4c (SEQ ID NO:57).

В настоящем изобретении предложено антитело, в котором гуманизованная переменная область тяжелой цепи hu3D6VHv1bA11, также известная как h3D6Hu5, (SEQ ID NO: 18) объединена с гуманизованной переменной областью легкой цепи hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (L2-DIM4, SEQ ID NO: 122). В настоящем изобретении предложено антитело, в котором гуманизованная переменная область тяжелой цепи hu3D6VHv1bA11, также известная как h3D6Hu5, (SEQ ID NO: 18) объединена с гуманизованной переменной областью легкой цепи hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (L2-DIM5, SEQ ID NO: 123). В настоящем изобретении предложено антитело, в котором гуманизованная переменная область тяжелой цепи h3D6VHvb8 (SEQ ID NO: 146) объединена с гуманизованной переменной областью легкой цепи hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (L2-DIM4, SEQ ID NO: 122). В настоящем изобретении предложено антитело, в котором гуманизованная переменная область тяжелой цепи hu3D6VHv1bA11, также известная как h3D6Hu5, (SEQ ID NO: 18) объединена с гуманизованной переменной областью легкой цепи hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (L2-DIM3, SEQ ID NO: 121). В настоящем изобретении предложено антитело, в котором гуманизованная переменная область тяжелой цепи hu3D6VHv1bA11, также известная как h3D6Hu5, (SEQ ID NO: 18) объединена с гуманизованной переменной областью легкой цепи hu3D6VLv2 S52G (L2-DIM9, SEQ ID NO: 110). В настоящем изобретении предложено антитело, в котором гуманизованная переменная область тяжелой цепи h3D6VHvb8 (SEQ ID NO: 146) объединена с гуманизованной переменной областью легкой цепи

hu3D6VLv2 L54G (L2-DIM7, SEQ ID NO: 94). В настоящем изобретении предложено антитело, в котором гуманизованная переменная область тяжелой цепи hu3D6VHv1bA11, также известная как h3D6Hu5, (SEQ ID NO: 18) объединена с гуманизованной переменной областью легкой цепи hu3D6VLv2 L50G (L2-DIM22, SEQ ID NO: 103).

В настоящем изобретении предложено антитело, в котором любая из иллюстративных гуманизованных переменных областей тяжелой цепи объединена с константной областью тяжелой цепи человека. Иллюстративная константная область тяжелой цепи человека представлена как SEQ ID NO: 176 (IgG1: аллотип G1m17,1). Например, в SEQ ID NO: 178 представлена аминокислотная последовательность зрелой тяжелой цепи гуманизованного варианта 3D6 (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 аллотип). Например, в SEQ ID NO: 180 представлена аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизованного варианта 3D6 (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 аллотип) с сигнальным пептидом бычьего альфа-лактальбумина на N-конце. В настоящем изобретении предложено антитело, в котором любая из иллюстративных гуманизованных переменных областей легкой цепи объединена с константной областью легкой цепи. Иллюстративная константная область легкой цепи представлена как SEQ ID NO: 177 (каппа). Например, в SEQ ID NO: 179 представлена аминокислотная последовательность зрелой легкой цепи гуманизованного варианта 3D6 (hu3D6VLv2 вариант L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 каппа). Например, в SEQ ID NO: 181 представлена аминокислотная последовательность легкой цепи гуманизованного варианта 3D6 (hu3D6VLv2 вариант L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 каппа) с сигнальным пептидом бычьего альфа-лактальбумина на N-конце.

В настоящем изобретении предложены варианты гуманизованного антитела 3D6, в которых гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с

hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76), hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77), hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78), hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79), hu3D6Hvb5 (SEQ ID NO:80), hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91), hu3D6VHv1bA11 D60E (h3D6VHvb8, SEQ ID NO:146), hu3D6VHv1bA11 L82cV (SEQ ID NO:147) или hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9, SEQ ID NO:148),

И гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с

hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83), hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84), hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85), hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54N (SEQ ID NO:95), hu3D6VLv2 L54E (SEQ ID NO:96), hu3D6VLv2 L50E (SEQ ID NO:97), hu3D6VLv2 L54Q (SEQ ID NO:98), hu3D6VLv2 L50D (SEQ ID NO:99), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101), hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103), hu3D6VLv2 I48G (SEQ ID NO:104), hu3D6VLv2 I48D (SEQ ID NO:105), hu3D6VLv2 L47G (SEQ ID NO:106), hu3D6VLv2 Y49E (SEQ ID NO:107), hu3D6VLv2 L54V (SEQ ID NO:108), hu3D6VLv2 L54S (SEQ ID NO:109), hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L47N (SEQ ID NO:111), hu3D6VLv2 L47D (SEQ ID NO:112), hu3D6VLv2 L47E (SEQ ID NO:113), hu3D6VLv2 L47P (SEQ ID NO:114), hu3D6VLv2 L47T (SEQ ID NO:115), hu3D6VLv2 L47S (SEQ ID NO:116), hu3D6VLv2 L47A (SEQ ID NO:117), hu3D6VLv2 L50V (SEQ ID NO:118), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124), hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125), hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128), hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131), hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2

L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (SEQ ID NO:134), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (SEQ ID NO:135), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143) или hu3D6VLv2 G100Q (SEQ ID NO:144).

В некоторых таких антителах сохраняется по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или все 44 из обратных мутаций или других мутаций в SEQ ID NO: 76-80, SEQ ID NO: 90-91, SEQ ID NO: 146-148, SEQ ID NO: 83-85 и SEQ ID NO: 93-145.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: H93 занято S и H94 занято T. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H93 и H94 заняты S и T соответственно.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение H91 в области VH занято F.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: H1 занято E, H5 занято V, H11 занято V, H20 занято I, H23 занято K, H38 занято R, H42 занято G, H43 занято K, H66 занято R, H75 занято T, H76 занято D, H81 занято E, H108 занято L, H109 занято V. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H75, H76, H81, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, L и V соответственно.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: H17 занято T, H80 занято M, H83 занято R. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H17, H80 и H83 в области VH заняты T, M и R соответственно.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение H58 в области VH занято I.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: H28 занято T, H67 занято V. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H28 и H67 в области VH заняты T и V соответственно.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: H54 занято D, H56 занято E. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H54 и H56 в области VH заняты D и E соответственно.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занято аминокислотой, как указано: H1 занято Q или E, H5 занято Q или V, H11 занято L или V, H17 занято S или T, H20 занято L или I, H23 занято T или K, H28 занято N или T, H38 занято K или R, H42 занято E или G, H43 занято Q или K, H54 занято N или D, H56 занято D или E, H58 занято V или I, H66 занято K или R, H67 занято A или V, H75 занято S или T, H76 занято N или D, H80 занято L или M, H81 занято Q или E, H83 занято T или R, H91 занято F или Y, H93 занято S, H94 занято T, H108 занято T или L, H109 занято L или V.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H91, H93 и H94 в области VH заняты F, S и T, соответственно, как в huVHvb1. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H75, H76, H81, H91, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, F, S, T, L и V, соответственно, как в huVHvb2. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H1, H5, H11, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H58, H66, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, T, I, K, R, G, K, I, R, T, D, M, E, R, S, T, L и V, соответственно, как в huVHvb3. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, I, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L и V, соответственно, как в huVHvb4. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, I, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L и V, соответственно, как в huVHvb5. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H91, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, R, V, T, D, M, E, R, F, S, T, L и V, соответственно, как в huVHvb6. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH заняты E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L и V, соответственно, как в huVHvb7.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение H60 занято E, как в hu3D6VHvb1bA11 D60E (h3D6VHvb8). В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение H82C занято V, как в

hu3D6VHv1bA11 L82cV. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H60, H80, H81, H82с и H83 заняты E, M, E, V и R, как в hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9).

Вариабельная область тяжелой цепи любого из упомянутых выше антител может быть модифицирована для дальнейшего снижения иммуногенности. Например, в некоторых гуманизированных антителах положение H80 занято M и/или положение H82с занято V.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято аминокислотой, как указано: L7 занято S, L10 занято S, L15 занято L, L83 занято V, L86 занято Y и L106 занято I. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L7, L10, L15, L83, L86 и L106 заняты S, S, L, V, Y и Y соответственно.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занято аминокислотой, как указано: L7 представляет собой T или S, L10 представляет собой T или S, L15 представляет собой I или L, L17 представляет собой Q или E, L24 представляет собой K или R, L37 представляет собой L или Q, L45 представляет собой K или R, L83 представляет собой L или V, L86 представляет собой H или Y, L100 представляет собой A или Q, L106 представляет собой L или I.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L7, L10, L15, L83, L86 и L106 в области VL заняты S, S, L, V, Y и I, соответственно, как в huVLvb2. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L7, L10, L15, L17, L24, L37, L45, L83, L86, L100 и L106 в области VL заняты S, S, L, E, R, Q, R, V, Y, Q и I, соответственно, как в huVLvb3.

Вариабельная область легкой цепи любого из упомянутых выше антител может быть модифицирована для дальнейшего снижения иммуногенности. Например, в некоторых гуманизированных антителах положение L47 занято G, N, D, E, P, T, S или A; положение L48 занято G или D; положение L49 занято E; положение L50 занято E, D, G или V; положение L52 занято G; и/или положение L54 занято D, G, N, E, Q, K, R, T, V или S. Вариабельная область тяжелой цепи любого из упомянутых выше антител может быть модифицирована для дальнейшего снижения иммуногенности. Например, в некоторых гуманизированных антителах положение H80 занято M и/или положение H82с занято V.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L54 занято D, как в hu3D6VLv2 L54D. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L54 занято G, как в hu3D6VLv2 L54G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L54 занято N, как в hu3D6VLv2 L54N. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L54 занято E, как в hu3D6VLv2 L54E. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L50 занято E, как в hu3D6VLv2 L50E. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L54 занято Q, как в hu3D6VLv2 L54Q. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L50 занято D, как в hu3D6VLv2 L50D. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L54 занято K, как в hu3D6VLv2 L54K. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L54 занято R, как в hu3D6VLv2 L54R. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L54 занято T, как в hu3D6VLv2 L54T. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L50 занято G, как в hu3D6VLv2 L50G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L48 занято G, как в hu3D6VLv2 I48G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L48 занято D, как в hu3D6VLv2 I48D. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L47 занято G, как в hu3D6VLv2 L47G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L49 занято E, как в hu3D6VLv2 Y49E. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L54 занято V, как в hu3D6VLv2 L54V. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L54 занято S, как в hu3D6VLv2 L54S. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L52 занято G, как в hu3D6VLv2 S52G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L47 занято N, как в hu3D6VLv2 L47N. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L47 занято D, как в hu3D6VLv2 L47D. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L47 занято E, как в hu3D6VLv2 L47E. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L47 занято P, как в hu3D6VLv2 L47P. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L47 занято T, как в hu3D6VLv2 L47T. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L47 занято S, как в hu3D6VLv2 L47S. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L47 занято A, как в hu3D6VLv2 L47A. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L50 занято V, как в hu3D6VLv2 L50V.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L50 и L54 заняты Q, G и R, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L50 и L54 заняты Q, G и G, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L52 и L54 заняты Q, G и G, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L52 и L54 заняты Q, G и R, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L52 и L54 заняты Q, G и T, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L52 и L54 заняты Q, G и D, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37 и L54 заняты Q и R, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L54R. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37 и L54 за-

няты Q и G, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L54G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37 и L54 заняты Q и D, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L54D. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37 и L50 заняты Q и G, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37 и L50 заняты Q и D, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50D. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37 и L54 заняты Q и T, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L54T. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37 и L52 заняты Q и G, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_S52G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37 и L54 заняты Q и E, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L54E.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L50 и L54 заняты Q, D и G, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L50 и L54 заняты Q, D и R, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L50 и L54 заняты Q, E и G, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L50 и L54 заняты Q, E и R, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L50, L54 и L100 заняты Q, G, R и Q, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L50, L54 и L100 заняты Q, G, G и Q, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L52, L54 и L100 заняты Q, G, R и Q, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L52, L54 и L100 заняты Q, G, D и Q, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L50, L54 и L100 заняты Q, D, G и Q, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L50, L54 и L100 заняты Q, D, R и Q, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L37, L50, L54 и L100 заняты Q, V, D и Q, соответственно, как в hu3D6VLv2 L37Q_L50VL54D_G100Q.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L37 занято Q, как в hu3D6VLv2 L37Q. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положение L100 занято Q как в hu3D6VLv2 G100Q.

Некоторые гуманизированные 3D6 антитела содержат зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR H1, H2 и H3, содержащие SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно, за исключением того, что положение H28 может быть занято N или T, H54 может быть занято N или D, H56 может быть занято D или E, положение H58 занято V или I и положение H60 может быть занято D или E, и зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR L1, L2 и L3, содержащие SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно, за исключением того, что положение L24 может быть занято K или R, положение L50 может быть занято L, E, D, G или V, положение L52 может быть занято S или G и положение L54 может быть занято L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V или S, при этом по меньшей мере одно из следующих положений занято аминокислотой, как указано: H1 занято Q, H5 занято Q, H11 занято L, H20 занято L, H23 занято T, H38 занято K, H75 занято S, H56 занято E, H58 занято I, H60 занято E, H82с занято V, L10 занято T, L17 занято E, L24 занято R, L37 занято Q, L47 занято G, N, D, E, P, T, S или A, L48 занято G или D, L49 занято E, L50 занято E, D, G или V, L52 занято G, L54 занято D, G, N, E, Q, K, R, T, V или S, L83 занято L, L86 занято H, L100 занято Q, L106 занято L.

Некоторые гуманизированные 3D6 антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 3D6, при этом 3D6 представляет собой мышинное антитело, характеризующееся вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 7, и вариабельной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 11, за исключением того, что положение H27 может быть занято F или Y, положение H28 может быть занято N или T, положение H29 может быть занято I или F, положение H30 может быть занято K или T, положение H51 может быть занято I или V, положение H54 может быть занято N или D, положение H60 может быть занято D, A или E, положение H61 может быть занято P или E, положение H102 может быть занято F или Y, положение L50 может быть занято L, E, D, G или V, положение L52 может быть занято S или G и положение L54 может быть занято L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V или S, при этом по меньшей мере одно из следующих положений занято аминокислотой, как указано: L37 занято Q, L47 занято G, N, D, E, P, T, S или A, L48 занято G или D, L49 занято E, L50 занято E, D, G или V, L52 занято G, L54 занято D, G, N, E, Q, K, R, T, V или S, L100 занято Q, H60 занято E, H82с занято V.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах вариабельная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых гуманизированных антителах 3D6 вариабельная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых гуманизированных антителах 3D6 каждая из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии

человека $\geq 85\%$. В некоторых гуманизированных антителах 3D6 три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 8, 9 и 10), и три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 12, 13 и 14); при условии, что положение H28 занято N или T, положение H54 занято N или D, положение H56 занято D или E, положение H58 занято V или I, положение H60 занято D или E, положение L24 занято K или R, положение L50 занято L, E, D, G или V, положение L52 занято S или G, и положение L54 занято L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V или S. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах CDR-H1 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах CDR-H2 согласно Кэботу имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 149. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах CDR-L1 согласно Кэботу имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 89. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах CDR-L2 согласно Кэботу содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 150-175.

Участки CDR таких гуманизированных антител могут являться идентичными или по существу идентичными участкам CDR 3D6. Участки CDR можно определить согласно любому общепринятому определению (например, Чотиа или сводному определению Чотиа и Кэбота), но, предпочтительно, они определены согласно определению Кэбота.

Каркасные положения переменных областей соответствуют нумерации Кэбота, если не указано обратное. Другие такие варианты, как правило, отличаются от последовательностей иллюстративных тяжелой и легкой цепей Hu3D6 небольшим количеством (например, как правило, не более 1, 2, 3, 5, 10 или 15) замещений, делеций или вставок. Такие различия обычно присутствуют в каркасном участке, но могут также возникать в CDR.

Возможность дополнительной вариации в гуманизированных вариантах 3D6 заключается в дополнительных обратных мутациях в каркасных участках переменной области. Множество каркасных остатков, которые не осуществляют контакт с CDR в гуманизированном МАТ (моноклональном антителе), могут содержать замены аминокислот из соответствующих положений донорного МАТ мыши или других антител мыши или человека, и даже многие потенциальные осуществляющие контакт с CDR остатки также поддаются замене. Даже аминокислоты в пределах CDR можно заменить, например, остатками, обнаруженными в соответствующем положении акцепторной последовательности человека, использованной для обеспечения каркасных участков переменной области. Помимо этого, можно применять альтернативные акцепторные последовательности человека, например, для тяжелой и/или легкой цепей. Если применяют различные акцепторные последовательности, одну или более из обратных мутаций, рекомендованных выше, можно не осуществлять, поскольку соответствующие донорные и акцепторные остатки уже являются одинаковыми без обратных мутаций.

Предпочтительно, замены или обратные мутации в гуманизированных вариантах 3D6 (будь то консервативные или нет) не оказывают существенного эффекта в отношении аффинности связывания или активности гуманизированного МАТ, то есть, в отношении его способности связываться с тау.

Гуманизированные антитела 3D6 дополнительно характеризуются их способностью связываться как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным тау и неправильно свернутыми/агрегированными формами тау.

D. Химерные и венированные антитела.

В настоящем изобретении также предложены химерная и венированная формы антител, отличных от антител человека, в частности, антител 3D6 согласно примерам.

Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые переменные области легкой и тяжелой цепей антитела, отличного от антитела человека (например, мыши), объединены с константными областями легкой и тяжелой цепей человека. Такие антитела по существу или полностью сохраняют специфичность связывания антитела мыши и состоят приблизительно на две трети из последовательности человека. Согласно варианту реализации химерное антитело 3D6 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 72 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 73.

Венированное антитело представляет собой тип гуманизированного антитела, который сохраняет некоторые и обычно все из CDR и некоторые из каркасных остатков переменной области, отличных от остатков человека, антитела, отличного от антитела человека, но в котором другие каркасные остатки переменной области, которые могут вносить вклад в В- или Т-клеточные эпитопы, например, экспонированные остатки (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991), заменены остатками из соответствующих положений последовательности антитела человека. Результатом является антитело, в котором CDR получен полностью или по существу из антитела, отличного от антитела человека, и каркасные участки переменной области антитела, отличного от антитела человека, являются более подобными человеку благодаря заменам. Венированные формы антитела 3D6 включены в настоящее изобретение.

E. Антитела человека.

Антитела человека против тау или его фрагмента (например, остатков аминокислот 199 - 213 и/или

262 - 276 в SEQ ID NO: 3, соответствующих остаткам аминокислот 257 - 271 и/или 320 - 334, соответственно, в SEQ ID NO: 1, или остаткам аминокислот 259-268 или 290-299 или 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1 или любой комбинации 2, 3 или всех 4) предложены посредством множества методик, описанных ниже. Некоторые антитела человека отобраны посредством конкурентных анализов связывания, посредством способа фагового дисплея согласно Winter, см. выше, или иным способом, чтобы данные антитела характеризовались той же эпитопной специфичностью, что и конкретное антитело мыши, такое как одно из моноклональных антител мыши, описанных в примерах. Можно также провести скрининг антител человека в отношении конкретной эпитопной специфичности посредством применения в качестве антигена-мишени только фрагмента тау, такого как фрагмент тау, содержащий исключительно остатки аминокислот 199 - 213 или 262 - 276 в SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 257 - 271 или 320 - 334, соответственно, в SEQ ID NO: 1), или содержащий исключительно остатки аминокислот 259-268 или 290-299 или 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1, в качестве антигена-мишени, и/или посредством проведения скрининга антител против совокупности вариантов тау, таких как варианты тау, содержащие различные мутации в пределах остатков аминокислот 199 - 213 или 262 - 276 в SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 257 - 271 или 320 - 334, соответственно, в SEQ ID NO: 1) или в пределах остатков аминокислот 259-268 или 290-299 или 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1.

Способы получения антител человека включают способ триомы согласно публикациям Oestberg et al., *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, патенту США № 4634664; и Engleman et al., патент США 4634666, применение трансгенных мышей, содержащих гены иммуноглобулина человека (см., например, публикации Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5877397; US 5874299; US 5814318; US 5789650; US 5770429; US 5661016; US 5633425; US 5625126; US 5569825; US 5545806; Neuberger, *Nat. Biotechnol.* 14:826 (1996); и Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)), способы фагового дисплея (см., например, публикации Dower et al., WO 91/17271; McCafferty et al., WO 92/01047; US 5877218; US 5871907; US 5858657; US 5837242; US 5733743; и US 5565332); и способы, описанные в публикации WO 2008/081008 (например, иммортализация В-клеток памяти, выделенных от человека, например, с помощью ВЭБ (вируса Эпштейна-Барр), проведение скрининга в отношении желаемых свойств и клонирование и экспрессия рекомбинантных форм).

Ф. Выбор константной области.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепей химерного, венированного или гуманизированного антител можно присоединить к по меньшей мере части константной области человека. Выбор константной области зависит отчасти от того, являются ли желательными антителозависимая опосредованная клетками цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплементзависимая цитотоксичность. Например, изоформы IgG1 и IgG3 человека характеризуются комплементзависимой цитотоксичностью, а изоформы IgG2 и IgG4 человека - не характеризуются ею. IgG1 и IgG3 человека также вызывают более мощные опосредованные клетками эффекторные функции, чем IgG2 и IgG4 человека. Константные области легкой цепи могут представлять собой ламбда или каппа. Системы нумерации для константных областей включают нумерацию EU (Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969)), нумерацию Кэбота (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991), уникальную нумерацию IMGT (Lefranc M.-P. et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains*, *Dev. Comp. Immunol.*, 29, 185-203 (2005) и нумерацию экзонов IMGT (Lefranc, ссылка выше).

Одна или более аминокислот на amino- или карбоксильном конце легкой и/или тяжелой цепи, такие как С-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или могут быть дериватизированными в части молекул или во всех молекулах. В константные области могут быть внесены замены для снижения или повышения эффекторной функции, такой как опосредованная комплементом цитотоксичность или АЗКЦ (см., например, публикации Winter et al., патент США No. 5,624,821; Tso et al., патент США No. 5,834,597; и Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006), или для увеличения периода полужизни у человека (см., например, публикацию Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004). Иллюстративные замены включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428 (в данном абзаце для константной области используется нумерация EU) для увеличения периода полужизни антитела. Замена в любом или всех положениях 234, 235, 236 и/или 237 снижает аффинность в отношении рецепторов Fcγ, в частности, рецептора FcγRI (см., например, US 6624821). Замену аланина в положениях 234, 235 и 237 IgG1 человека можно применять для снижения эффекторных функций. Некоторые антитела содержат замену аланина в положениях 234, 235 и 237 IgG1 человека для снижения эффекторных функций. Необязательно, положения 234, 236 и/или 237 в IgG2 человека замещены аланином, а положение 235 - глутамином (см., например, публикацию US 5624821). В некоторых антителах применяют мутацию в одном или нескольких из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331 IgG1 человека согласно нумерации EU. В некоторых антителах применяют мутацию в одном или нескольких из положений 318, 320 и 322 IgG1 человека согласно нумерации EU. В некоторых антителах положения 234 и/или 235 замещены аланином, и/или положение 329 замещено глицином. В некоторых антителах положения 234 и 235 замещены аланином. В некоторых антителах изотип представляет собой IgG2 или IgG4 человека.

Антитела можно экспрессировать в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv или в виде одноцепочечных антител, в которых зрелые переменные домены тяжелой и легкой цепей соединены посредством спейсера.

Константные области человека демонстрируют аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию между различными индивидуумами; это означает, что константные области у различных индивидуумов могут отличаться в одном или нескольких полиморфных положениях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотка, распознающая изоаллотип, связывается с непалиморфной областью одного или нескольких других изотипов. Таким образом, например, другая константная область тяжелой цепи получена из G1m3 IgG1 с С-концевым лизином или без него. Упоминание о константной области человека включает константную область с любым природным аллотипом или любой пермутацией остатков, занимающих положения в природных аллотипах. Иллюстративная константная область тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 176, с С-концевым лизином или без него, и иллюстративная константная область легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 177.

G. Экспрессия рекомбинантных антител.

Известно множество способов получения химерных и гуманизированных антител с применением экспрессирующей антитела линии клеток (например, гибридомы). Например, переменные области иммуноглобулина антител можно клонировать и секвенировать с применением хорошо известных способов. В одном способе переменную область VH тяжелой цепи клонируют посредством ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) с применением мРНК, полученной из клеток гибридомы. Консенсусные праймеры применяют в отношении лидерного пептида области VH, содержащего кодон инициации трансляции в качестве 5'-праймера и специфичный к константной области g2b 3'-праймер. Иллюстративные праймеры описаны в публикации патента США US 2005/0009150 автора Schenk et al. (здесь и далее "Schenk"). Последовательности из множества независимо полученных клонов можно сравнить, чтобы убедиться, что в течение амплификации не были введены изменения. Последовательность области VH можно также определить или подтвердить посредством секвенирования фрагмента VH, полученного посредством методологии 5'-RACE ОТ-ПЦР и 3' g2b-специфичного праймера.

Переменную область VL легкой цепи можно клонировать аналогичным способом. Согласно одному подходу разрабатывают набор консенсусных праймеров для амплификации областей VL с применением 5'-праймера, разработанного для гибридизации с областью VL, содержащего кодон инициации трансляции, и 3'-праймера, специфичного к области Ск, ниже по течению от соединяющей области V-J. Согласно второму подходу для клонирования кДНК, кодирующей VL, применяют методологию 5'-RACE ОТ-ПЦР. Иллюстративные праймеры описаны в публикации Schenk, ссылка выше. Затем клонированные последовательности объединяют с последовательностями, кодирующими константные области человека (или других видов, отличных от человека).

Согласно одному подходу переменные области тяжелой и легкой цепей реконструируют, чтобы они кодировали сплайс-донорные последовательности ниже по течению от соответствующих соединений VDJ или VJ, и клонируют в вектор экспрессии млекопитающего, такой как pCMV-hy1 для тяжелой цепи и pCMV-Mc1 для легкой цепи. Данные векторы кодируют константные области $\gamma 1$ и Ск человека в виде экзонных фрагментов ниже по течению от встроенной кассеты переменной области. После подтверждения последовательности клетки CHO можно котрансфицировать векторами экспрессии тяжелой цепи и легкой цепи для получения химерных антител. Кондиционированную среду собирают через 48 ч после трансфекции и анализируют методом вестернблоттинга в отношении продукции антитела или методом ELISA в отношении связывания с антигеном. Химерные антитела являются гуманизированными, как описано выше.

Химерные, венеризированные, гуманизированные антитела и антитела человека, как правило, получают посредством рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции, как правило, содержат последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с кодирующими последовательностями цепей антитела, включая связанные в природе или гетерологичные элементы контроля экспрессии, такие как промотор. Последовательности контроля экспрессии могут представлять собой системы промоторов в векторах, способных к трансформации или трансфекции эукариотических или прокариотических клеток-хозяев. После того как вектор был встроен в соответствующего хозяина, хозяина поддерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей и сбора и очистки перекрестно-реактивных антител.

Данные векторы экспрессии, как правило, являются реплицируемыми в организмах хозяев в виде эпизом или составной части хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии содержат селективные маркеры, например, устойчивость к ампициллину или устойчивость к гигромицину, чтобы обеспечить обнаружение тех клеток, которые были трансформированы желаемыми последовательностями ДНК.

E. coli представляет собой один из прокариотических хозяев, пригодных для экспрессии антител, в частности, фрагментов антитела. Микроорганизмы, такие как дрожжи, также пригодны для экспрессии.

Saccharomyces представляет собой дрожжевого хозяина с подходящими векторами, которые по желанию содержат последовательности контроля экспрессии, точку начала репликации, последовательности терминации и т.п. Типичные промоторы включают 3-фосфоглицераткиназу и другие гликолитические ферменты. Индуцибельные промоторы дрожжей включают, среди прочих, промоторы из алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома С и ферментов, отвечающих за утилизацию мальтозы и галактозы.

Клетки млекопитающих можно применять для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. руководство Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Было разработано множество подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и такие линии клеток-хозяев включают линии клеток CHO, различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и не продуцирующие антитела миеломы, включая Sp2/0 и NS0. Клетки могут являться отличными от клеток человека. Векторы экспрессии для данных клеток могут содержать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), и необходимые информационные сайты процессинга, такие как сайты связывания рибосомы, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминатора транскрипции. Последовательности контроля экспрессии могут содержать промоторы, полученные из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего папилломавируса, и т.п. См. публикацию Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

В качестве альтернативы, кодирующие антитело последовательности можно встроить в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоко трансгенного животного (см., например, патент США № 5,741,957; патент США № 5,304,489; и патент США № 5,849,992). Подходящие трансгены включают кодирующие последовательности для легкой и/или тяжелой цепей, функционально связанные с промотором и энхансером из гена, специфичного к молочной железе, такого как казеин или бета-лактоглобулин.

Векторы, содержащие сегменты ДНК, представляющие интерес, можно перенести в клетку-хозяин способами, которые зависят от типа клеточного хозяина.

Например, для прокариотических клеток обычно применяют трансфекцию на основе хлорида кальция, в то время как для других клеточных хозяев можно применять обработку фосфатом кальция, электропорацию, липофекцию, баллистическую трансфекцию или трансфекцию на основе вирусов. Другие способы, используемые для трансформации клеток млекопитающих, включают применение полибрена, слияние протопластов, липосом, электропорацию и микроинъекцию. Для получения трансгенных животных трансгены можно микроинъектировать в оплодотворенные ооциты или можно встроить в геном эмбриональных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), и ядро таких клеток перенести в энуклеированные ооциты.

После введения вектора или векторов, кодирующих тяжелые и легкие цепи антитела, в клеточную культуру, можно провести скрининг пулов клеток в отношении продуктивности роста и качества продукта в бессывороточной среде. Затем пулы клеток с высокой продуктивностью можно подвергнуть одноклеточному клонированию на основе FACS для создания моноклональных линий. Можно применять удельные продуктивности более 50 пг или 100 пг на клетку в день, что соответствует титрам продукта более 7,5 г/л культуры. Антитела, продуцируемые одноклеточными клонами, также можно исследовать в отношении мутности, фильтрационных свойств методом ПААГ (электрофореза в полиакриламидном геле), ИЭФ (изоэлектрического фокусирования), сканирования в УФ-области, высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ), углеводно-олигосахаридного картирования, масс-спектрометрии и анализа связывания, такого как ELISA или *Viasoge*. Отобранный клон можно затем использовать для создания банка клеток во множестве флаконов и хранить в замороженном виде для последующего использования.

После экспрессии антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными способами, известными в данной области техники, включая захват белком А, очистку ВЭЖХ, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п. (см., в общих чертах, руководство Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Можно применять методологии для коммерческого получения антител, включая оптимизацию кодона, отбор промоторов, отбор элементов транскрипции, отбор терминаторов, бессывороточное одноклеточное клонирование, создание банков клеток, использование селективных маркеров для амплификации числа копий, терминатор CHO или улучшение титров белков (см., например, публикации US 5786464; US 6114148; US 6063598; US 7569339; W02004/050884; W02008/012142; W02008/012142; W02005/019442; W02008/107388; W02009/027471; и US 5888809).

IV. Активные иммуногены.

Средство, применяемое для активной иммунизации, выступает для индукции у пациента тех же типов антитела, как описано выше применительно к пассивной иммунизации. Средства, применяемые для активной иммунизации, могут относиться к тем же типам иммуногенов, которые применяют для продукции моноклональных антител у лабораторных животных, например, пептид из 3 - 15, или 3 - 12, или 5-12, или 5-8 смежных аминокислот из области тау, соответствующей остаткам 199 - 213 или 262 - 276 в SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам 257 - 271 или 320 - 334, соответственно, в SEQ ID NO: 1), такой как,

например, пептид, содержащий остатки 199 -213 или 262 - 276 в SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам 257 - 271 или 320 - 334, соответственно, в SEQ ID NO: 1), такой как, например, пептид, содержащий остатки 199-213 или 262-276 в SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам 257-271 или 320-334, соответственно, в SEQ ID NO: 1), или из области тау, соответствующей остаткам 259-268 или 290-299 или 321-330 или 353-362 of SEQ ID NO: 1, такой как, например, пептид, содержащий остатки 259-268 или 290-299 или 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1. Для индукции антител, связывающихся с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и 3D6, можно картировать специфичность эпитопа для данных антител (например, посредством исследования связывания с сериями перекрывающихся пептидов, охватывающих тау). Затем фрагмент тау, состоящий из эпитопа, или содержащий эпитоп, или перекрывающийся с эпитопом, можно применять в качестве иммуногена. Такие фрагменты, как правило, применяют в нефосфорилированной форме.

Гетерологичный носитель и адъювант в случае использования могут являться такими же, которые применяли для получения моноклонального антитела, но могут также быть выбранными для лучшей фармацевтической пригодности с целью применения у человека. Подходящие носители включают сывороточные альбумины, гемоглобин фисуреллы, молекулы иммуноглобулина, тироглобулин, овалбумин, столбнячный анатоксин или анатоксин другой патогенной бактерии, такой как дифтерийный анатоксин (например, CRM197), анатоксин *E. coli*, холерный или *H. pylori*, или аттенуированное производное токсина. Т-клеточные эпитопы также являются подходящими молекулами-носителями. Некоторые конъюгаты могут быть образованы посредством связывания средств согласно настоящему изобретению с иммуностимулирующей полимерной молекулой (например, трипальмитоил-S-глицерин цистеином (Pam₃Cys), маннаном (полимером маннозы) или глюканом (β 1→2 полимер)), цитокинами (например, ИЛ-1, α - и β -пептидами ИЛ-1, ИЛ-2, γ -INF, ИЛ-10, ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором)) и хемокинами (например, MIP1- α и β , и RANTES). Иммуногены могут быть соединены с носителями посредством спейсерных аминокислот (например, gly-gly) или без них. Дополнительные носители включают вирусоподобные частицы. Вирусоподобные частицы (ВПЧ), также называемые псевдовирионами или полученными из вирусов частицами, представляют собой субъединичные структуры, состоящие из множества копий вирусного капсида и/или белка оболочки, способного к самосборке *in vivo* в ВПЧ определенной сферической симметрии. (Powilleit, et al. (2007) PLoS ONE 2(5):e415.) В качестве альтернативы, пептидные иммуногены можно присоединить к по меньшей мере одному искусственному Т-клеточному эпитопу, способному к связыванию с большей частью молекул МНС Класса II, такому как универсальный DR-эпитоп ("PADRE"). PADRE описан в публикациях US 5736142, WO 95/07707 и Alexander J et al., *Immunity*, 1:751-761 (1994). Активные иммуногены могут быть представлены в мультимерной форме, в которой множество копий иммуногена и/или его носителя представлены в виде одной ковалентной молекулы.

Фрагменты часто вводят с фармацевтически приемлемыми адъювантами. Адъювант повышает титр индуцированных антител и/или аффинность связывания индуцированных антител по сравнению с ситуацией, когда пептид применяют сам по себе. Множество адъювантов можно применять в комбинации с иммуногенным фрагментом тау для вызова иммунного ответа. Предпочтительные адъюванты увеличивают внутренний ответ на иммуноген, не вызывая конформационных изменений в иммуногене, влияющих на качественную форму ответа. Предпочтительные адъюванты включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия, 3 De-O-ацилированный монофосфорил-липид А (MPL™) (см. GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Гамильтон, Монтана, сейчас часть Corixa). Stimulon™ QS-21 представляет собой тритерпеновый гликозид или сапонин, выделенный из коры дерева *Quillaja Saponaria* Molina, растущего в Южной Америке (см. публикацию Kensil et al., in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5057540), (Aquila BioPharmaceuticals, Фраминген, Массачусетс; сейчас Antigenics, Inc., Нью-Йорк, Нью-Йорк). Другие адъюванты представляют собой эмульсии "масло в воде" (такие как сквален или арахисовое масло), необязательно в комбинации с иммуностимулирующими средствами, такими как монофосфорил-липид А (см. публикацию Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), плюрониновые полимеры и убитые микобактерии. Адъюванты Ribi представляют собой эмульсии "масло в воде". Ribi содержит метаболизируемое масло (сквален), эмульгированное с солевым раствором, содержащим Tween 80. Ribi также содержит очищенные микобактериальные продукты, которые действуют в качестве иммуностимулирующих средств, и бактериальный монофосфорил-липид А. Другим адъювантом является CpG (WO 98/40100). Адъюванты можно вводить в виде компонентов терапевтической композиции совместно с активным средством или можно вводить отдельно перед, во время или после введения терапевтического средства.

Также можно применять аналоги природных фрагментов тау, которые индуцируют антитела против тау. Например, в таких пептидах одну или более либо все L-аминокислоты можно заменить D-аминокислотами. Также можно изменить порядок аминокислот на противоположное направление (ретропептид). Необязательно, пептид содержит все D-аминокислоты в обратном порядке (ретроинверсированный пептид). Пептиды и другие соединения, которые необязательно характеризуются значительным подобием аминокислотной последовательности с пептидами тау, но, несмотря на это, высту-

пают в качестве миметиков пептидов тау и индуцируют аналогичный иммунный ответ. Также можно применять антиидиотипические антитела против моноклональных антител против тау, как описано выше. Такие анти-Id антитела имитируют антиген и вызывают образование иммунного ответа против него (см. публикацию *Essential Immunology*, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., p. 181).

Пептиды (и, необязательно, носитель, слитый с пептидом) также можно вводить в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, и экспрессировать в пациенте *in situ*. Сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий иммуноген, как правило, присоединен к регуляторным элементам, таким как промотор и энхансер, которые обеспечивают экспрессию сегмента ДНК в предназначенных клетках-мишенях пациента. Для экспрессии в клетках крови, что является желательным для индукции иммунного ответа, элементы промотора и энхансера из генов легкой или тяжелой цепей иммуноглобулина или основного медленно-раннего промотора и энхансера ЦМВ (цитомегаловируса) являются подходящими для прямой экспрессии. Связанные регуляторные элементы и кодирующие последовательности часто клонируют в векторе. Антитела также можно вводить в форме нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую и/или легкую цепи антитела. Если присутствуют как тяжелая, так и легкая цепи, цепи предпочтительно соединяют в виде одноцепочечного антитела. Антитела для пассивного введения можно также получить, например, посредством аффинной хроматографии из сыворотки пациентов, которые получали пептидные иммуногены.

ДНК можно доставить в "оголенной" форме (т.е. без коллоидных или инкапсулирующих материалов). В качестве альтернативы, можно применять несколько систем вирусных векторов, включая ретровирусные системы (см., например, публикацию Lawrie and Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)); аденовирусные векторы (см., например, публикацию Bett et al., *J. Virol.* 67, 591-1 (1993)); включая векторы, полученные из ретровирусов, таких как MMLV, HIV-1 и ALV; аденоассоциированные вирусные векторы (см., например, публикацию Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), лентивирусные векторы, такие как векторы на основе HIV или FIV gag-последовательностей, вирусные векторы из семейства покс, включая вирус осповакцины и поксвирусы птиц, вирусные векторы из рода альфа-вирусов, такие как таковые, полученные из вирусов Синдбис и вируса леса Семлики (см., например, публикацию Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (см. US 5643576) и рабдовирусы, такие как вирус везикулярного стоматита (см. WO 96/34625) и папилломавирусы (Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629 и Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

ДНК, кодирующую иммуноген, или кодирующие тяжелую и/или легкую цепи антитела, или вектор, содержащий ДНК, можно упаковать в липосомы. Подходящие липиды и родственные аналоги описаны в публикациях US 5208036, US 5264618, US 5279833 и US 5283185. Векторы и ДНК, кодирующую иммуноген, или кодирующие тяжелую и/или легкую цепи антитела, можно также нанести на носители в форме частиц или связать с такими носителями, примеры которых включают полимеры на основе полиметакрилата и полилактиды, а также поли(лактид-ко-гликолиды) (см., например, публикацию McGee et al., *J. Micro Encap.* 1996).

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

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

Н. Скрининговые анализы антител.

Можно первоначально провести скрининг антител в отношении предназначенной специфичности связывания, как описано выше. Аналогичным способом можно провести скрининг активных иммуногенов в отношении способности индуцировать антитела с такой специфичностью связывания. В данном случае активный иммуноген применяют для иммунизации лабораторного животного, и полученную в результате сыворотку исследуют в отношении соответствующей специфичности связывания.

Затем антитела, которые характеризуются желаемой специфичностью связывания, можно исследовать на клеточных моделях и моделях на животных. Клетки, которые применяют для такого скрининга, предпочтительно, представляют собой нейронные клетки. Сообщалось о клеточной модели патологии

тау, в которой клетки нейробластомы трансфицировали доменом четырех повторов тау, необязательно с мутацией, связанной с патологией тау (например, дельта K280, см. публикацию Khlistunova, *Current Alzheimer Research* 4, 544-546 (2007)). В другой модели тау индуцируют в линии клеток нейробластомы N2a посредством добавления доксициклина. Клеточные модели позволяют изучить токсичность тау в отношении клеток в растворимом или агрегированном состоянии, возникновение агрегатов тау после включения экспрессии гена тау, растворение агрегатов тау снова после выключения экспрессии гена и эффективность антител при ингибировании образования агрегатов тау или их дезагрегации.

Также можно проводить скрининг антител или активных иммуногенов на моделях заболеваний, связанных с тау, на трансгенных животных. Такие трансгенные животные могут содержать трансген тау (например, любую из изоформ человека) и необязательно трансген APP человека, среди прочих, такой как киназа, которая фосфорилирует тау, ApoE, пресенилин или альфа-синуклеин. Такие трансгенные животные предрасположены к развитию по меньшей мере одного признака или симптома заболевания, связанного с тау.

Иллюстративное трансгенное животное представляет собой линию мышей K3 (Itner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(41): 15997-6002 (2008)). Данные мыши содержат трансген тау человека с мутацией K369 I (мутация связана с болезнью Пика) и промотор Thy 1.2. Данная модель демонстрирует быстрое течение нейродегенерации, двигательный дефект и дегенерацию афферентных волокон и гранулярных клеток мозжечка. Другое иллюстративное животное представляет собой линию мышей JNPL3. Данные мыши содержат трансген тау человека с мутацией P301L (мутация связана с лобно-височной деменцией) и промотор Thy 1.2 (Taconic, Germantown, N.Y., Lewis, et al., *Nat Genet.* 25:402-405 (2000)). Данные мыши характеризуются более ступенчатым течением нейродегенерации. У мышей развиваются нейрофибриллярные клубки в нескольких областях головного мозга и спинного мозга, публикация полностью включена посредством ссылки. Данная модель представляет собой превосходную модель для исследования последствий развития клубков и для скрининговой терапии, которая может ингибировать образование данных агрегатов. Другим преимуществом данных животных является относительно ранняя манифестация патологии. В гомозиготной линии можно наблюдать поведенческие аномалии, связанные с патологией тау, по меньшей мере уже в 3 месяца, но животные остаются относительно здоровыми по меньшей мере до возраста 8 месяцев. Другими словами, в 8 месяцев животные передвигаются, питаются и могут выполнять поведенческие задания достаточно хорошо для обеспечения мониторинга эффектов лечения. Активная иммунизация данных мышей в течение 6-13 месяцев с помощью AI wI KLN-PHF-1 позволяла получить титры приблизительно 1000 и продемонстрировала более редкие нейрофибриллярные клубки, меньше pSer422 и уменьшенное снижение веса по сравнению с контрольными мышами, которые не получали лечение.

Активность антител или активных агентов можно оценить посредством различных критериев, включая снижение количества суммарного тау или фосфорилированного тау, снижение других патологических характеристик, таких как отложения амилоида A β , и ингибирование или отсрочивание поведенческого дефицита. Активные иммуногены также можно исследовать на индукцию антител в сыворотке. И пассивные, и активные иммуногены можно исследовать в отношении прохождения антител через гематоэнцефалический барьер в головной мозг трансгенного животного. Антитела или фрагменты, индуцирующие антитело, можно также исследовать на приматах, отличных от человека, у которых природным путем или в результате индукции развиваются симптомы заболеваний, которые характеризуются тау. Исследования в отношении антитела или активного агента обычно проводят в сочетании с контролем, в котором проводят параллельный эксперимент, за исключением того, что антитело или активное средство отсутствует (например, заменены наполнителем). Затем снижение, отсрочивание или ингибирование признаков или симптомов заболевания, вызываемое антителом или активным средством, исследование которого проводят, можно оценить по сравнению с контролем.

V. Пациенты, поддающиеся лечению.

Присутствие нейрофибриллярных клубков было обнаружено при нескольких заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичную возрастную таупатию, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическую деменцию или деменцию боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа C, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь аргирофильных зерен, глобулярную глиальную таупатию, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальную дегенерацию (КБД), деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), глобулярную глиальную таупатию (GGT) и прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). Режимы согласно настоящему изобретению можно также применять при лечении или профилактике любого из данных заболеваний. По причине широко распространенной ассоциации между неврологическими заболеваниями и состояниями и тау режимы согласно настоящему изобретению можно применять при лечении или профилактике у любого субъекта, у которого наблюдаются повышенные уровни тау или фосфорилированного тау (например, в СМЖ), по сравнению со средним значением у индивидуумов без неврологических заболеваний. Режимы согласно настоящему изобретению можно также применять при лечении или профилактике неврологического забо-

ления у индивидуумов, содержащих мутацию в тау, связанную с неврологическим заболеванием. Способы согласно настоящему изобретению являются в особенности подходящими для лечения или профилактики болезни Альцгеймера, и особенно у пациентов.

Пациенты, поддающиеся лечению, включают индивидуумов, подверженных риску развития заболевания, но у которых не наблюдаются симптомы, а также пациентов, у которых на сегодняшний день наблюдаются симптомы. Пациенты, подверженные риску развития заболевания, включают таковых, которые подвержены известному генетическому риску развития заболевания. Такие индивидуумы включают таковых, родственники которых страдали от данного заболевания, и таковых, риск которых был определен в результате анализа генетических или биохимических маркеров. Генетические маркеры риска включают мутации в тау, такие как мутации, обсуждавшиеся выше, а также мутации в других генах, связанные с неврологическим заболеванием. Например, аллель ApoE4 в гетерозиготной, а еще более в гомозиготной форме связана с риском развития болезни Альцгеймера. Другие маркеры риска болезни Альцгеймера включают мутации в гене APP, в частности, мутации в положении 717 и положении 670 и 671, которые называют мутациями Hardy и Swedish, соответственно, мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, семейный анамнез БА (болезни Альцгеймера), гиперхолестеринемия или атеросклероз. Индивидуумов, которые на сегодняшний день страдают от болезни Альцгеймера, можно распознать посредством визуализации ПЭТ, на основании характерной деменции, а также присутствия факторов риска, описанных выше. Помимо этого, для идентификации индивидуумов, которые страдают от БА, доступно множество диагностических тестов. Данные тесты включают измерение уровней тау или фосфо-тау и A β 42 в СМЖ. Повышенные уровни тау или фосфо-тау и сниженные уровни A β 42 свидетельствуют о присутствии БА. Некоторые мутации связаны с болезнью Паркинсона. С болезнью Паркинсона связаны Ala30Pro или Ala53 либо мутации в других генах, таких как киназа с богатыми лейцином повторами, PARK8. Любое из неврологических заболеваний, упомянутых выше, можно также диагностировать у индивидуумов на основании критериев DSM IV TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition, text revision, Диагностическое и статистическое руководство по психическим расстройствам, четвертая редакция, пересмотренная).

У бессимптомных пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, 10, 20, 30). Однако обычно необязательно начинать лечение до тех пор, пока пациент не достигнет возраста 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение, как правило, предусматривает несколько доз в течение периода времени. Лечение можно контролировать посредством оценки уровней антитела в течение времени. Если ответ снижается, показана бустер-доза. В случае потенциальных пациентов с синдромом Дауна лечение можно начать до рождения посредством введения терапевтического средства матери или сразу после рождения.

I. Нуклеиновые кислоты.

В настоящем изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любую из тяжелой и легкой цепей, описанных выше (например, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 76-80, SEQ ID NO: 90-91, SEQ ID NO: 146-148, SEQ ID NO: 83-85, SEQ ID NO: 93-145 и SEQ ID NO: 178-181). Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь согласно настоящему изобретению, является SEQ ID NO: 182, и примером нуклеиновой кислотой, кодирующей легкую цепь согласно настоящему изобретению, является SEQ ID NO: 183. Необязательно такие нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, и их можно экспрессировать с сигнальным пептидом, присоединенным к вариативной области. Кодирующие последовательности нуклеиновых кислот могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, таких как промотор, энхансер, сайт связывания рибосомы, сигнал терминации транскрипции и т.п. Регуляторные последовательности могут включать промотор, например прокариотический промотор или эукариотический промотор. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые или легкие цепи, могут быть оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетке-хозяине. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут кодировать выбранный ген. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи, могут существовать в выделенной форме либо их можно клонировать в одном или нескольких векторах. Нуклеиновые кислоты можно синтезировать посредством, например, твердофазного синтеза или ПНР с перекрывающимися олигонуклеотидами. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи, можно соединить в виде одной непрерывной нуклеиновой кислоты, например, в векторе экспрессии, или такие нуклеиновые кислоты могут являться отдельными, например, каждую из них клонируют в свой собственный вектор экспрессии.

J. Конъюгированные антитела.

Конъюгированные антитела, которые специфично связываются с антигенами, такими как тау, являются подходящими для определения присутствия тау; контроля и оценки эффективности терапевтических средств, применяемых для лечения пациентов, у которых была диагностирована болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный

склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), глобулярная глиальная таупатия (GGT) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП); для ингибирования или снижения агрегации тау; ингибирования или снижения образования волокон тау; снижения или устранения отложений тау; стабилизации нетоксичных конформаций тау; или лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), глобулярной глиальной таупатии (GGT) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП) у пациента. Например, такие антитела можно конъюгировать с другими терапевтическими агентами, другими белками, другими антителами и/или обнаруживаемыми метками. См. публикации WO 03/057838; US 8455622. Такие терапевтические агенты могут представлять собой любое средство, которое можно применять для лечения, борьбы, облегчения, предотвращения или улучшения нежелательного состояния или заболевания у пациента, такого как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), глобулярная глиальная таупатия (GGT) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

Конъюгированные терапевтические агенты могут включать цитотоксические средства, цитостатические средства, нейротрофические средства, нейропротекторные средства, радиотерапевтические средства, иммуномодулирующие средства или любые биологически активные средства, которые облегчают или усиливают активность антитела. Цитотоксическое средство может представлять собой любое средство, которое является токсичным в отношении клетки. Цитостатическое средство может представлять собой любое средство, которое ингибирует пролиферацию клеток. Нейротрофическое средство может представлять собой любое средство, включая химические или белковые средства, которое стимулирует сохранение, рост или дифференциацию нейронов. Нейропротекторное средство может представлять собой средство, включая химические или белковые средства, которое защищает нейроны от острого инсульта или дегенеративных процессов. Иммуномодулятор может представлять собой любое средство, которое стимулирует или ингибирует развитие или поддержание иммунологического ответа. Радиотерапевтическое средство может представлять собой любую молекулу или соединение, которое испускает излучение. Если такие терапевтические агенты соединены со специфичным антителом против тау, таким как антитела, описанные в настоящем документе, присоединенные терапевтические агенты будут обладать специфичной аффинностью в отношении клеток, пораженных вызванным тау заболеванием, по сравнению с нормальными клетками. Как следствие, введение конъюгированных антител непосредственно нацеливается на клетки рака с минимальным повреждением окружающей нормальной здоровой ткани. Данный подход может быть в особенности подходящим для терапевтических агентов, которые являются слишком токсичными, чтобы их можно было вводить сами по себе. Помимо этого, можно применять более низкие количества терапевтических агентов.

Некоторые такие антитела можно модифицировать, чтобы они действовали в качестве иммунотоксинов. См., например, патент США № 5194594. Например, ризин, клеточный токсин, полученный из растений, можно объединить с антителами с применением бифункциональных реактивов S-ацетилмеркаптоантарного ангидрида для антитела и сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионата для ризицина. См. публикацию Pietersz et al., *Cancer Res.* 48(16):4469-4476 (1998). Объединение приводит к утрате связывающей активности В-цепи ризицина, при этом не нарушая ни токсичный потенциал А-цепи ризицина, ни активность антитела. Аналогично, сапорин, ингибитор сборки рибосом, можно присоединить к антителам посредством дисульфидной связи между введенными химическим способом сульфгидрильными группами. См. публикацию Polito et al., *Leukemia* 18:1215-1222 (2004).

Некоторые такие антитела можно присоединить к радиоактивным изотопам. Примеры радиоактивных изотопов включают, например, иттрий⁹⁰ (⁹⁰Y), индий¹¹¹ (¹¹¹In), ¹³¹I, ⁹⁹mTc, радиоактивное серебро-111, радиоактивное серебро-199 и висмут²¹³. Присоединение радиоактивных изотопов к антителам можно осуществить посредством общепринятых бифункциональных хелатов. Для присоединения радиоактивного серебра-111 и радиоактивного серебра-199 можно применять линкеры на основе серы. См. публикацию Nazra et al., *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Присоединение радиоактивных изотопов серебра может включать восстановление иммуноглобулина аскорбиновой кислотой. Для радиоактивных изотопов, таких как ¹¹¹In и ⁹⁰Y, можно применять ибритумаб тиуксетан, который будет вступать в реакцию с

такими изотопами с образованием ^{111}In -ибритутумаба тиуксетана и ^{90}Y -ибритутумаба тиуксетана соответственно. См. публикацию Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

Некоторые такие антитела можно присоединить к другим терапевтическим агентам. Такие терапевтические агенты могут являться, например, цитотоксическими, цитостатическими, нейротрофическими или нейропротекторными. Например, антитела можно конъюгировать с токсичными химиотерапевтическими лекарственными препаратами, такими как майтансин, гелданамицин, ингибиторы тубулина, такие как средства, связывающие тубулин (например, ауристатины), или средства, связывающиеся с малой бороздой, такие как калихеамицин. Другие типичные терапевтические агенты включают средства, которые, как известно, являются подходящими для лечения, ведения или облегчения болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), глобулярной глиальной таупатии (GGT) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП).

Антитела также можно объединить с другими белками. Например, антитела можно объединить с финомерами. Финомеры представляют собой небольшие связывающиеся белки (например, размером 7 кДа), полученные из домена Fyn SH3 человека. Финомеры могут являться стабильными и растворимыми, и в них могут отсутствовать остатки цистеина и дисульфидные связи. Финомеры могут быть сконструированы так, чтобы связываться с молекулами-мишенями с той же аффинностью и специфичностью, что и антитела. Они являются подходящими для создания мультиспецифичных слитых белков на основе антител. Например, финомеры могут являться слитыми с N-терминальным и/или C-терминальным концами антител для создания би- и триспецифичных FynomAb с различной архитектурой. Финомеры можно выбрать с применением библиотек финомеров посредством методик скрининга с применением FACS, Biacore и анализов на клетках, которые позволяют провести эффективный отбор финомеров с оптимальными свойствами. Примеры финомеров раскрыты в публикациях Grabulovski et al., *J. Biol. Chem.* 282:3196-3204 (2007); Bertschinger et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 20:57-68 (2007); Schlatter et al., *MAbs.* 4:497-508 (2011); Banner et al., *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(Pt6):1124-1137 (2013); и Brack et al., *Mol. Cancer Ther.* 13:2030-2039 (2014).

Антитела, раскрытые в настоящем документе, можно также объединить или конъюгировать с одним или несколькими другими антителами (например, с образованием гетероконъюгатов антител). Такие другие антитела могут связываться с отличными эпитопами в пределах тау или могут связываться с отличным антигеном-мишенью.

Антитела можно также объединить с обнаруживаемой меткой. Такие антитела можно применять, например, для диагностики болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), глобулярной глиальной таупатии (GGT) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), и/или для оценки эффективности лечения. Такие антитела являются в особенности подходящими для осуществления такого определения у субъектов, которые страдают от или предрасположены к болезни Альцгеймера, синдрому Дауна, легким когнитивным нарушениям, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитическому паркинсонизму, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерному параличу, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофическому латеральному склерозу/комплексу паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианту болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), глобулярной глиальной таупатии (GGT) или прогрессирующему надъядерному параличу (ПНП), или в соответствующих биологических образцах, полученных от таких субъектов. Типичные обнаруживаемые метки, которые можно объединить с антителом или присоединить к антителу, включают различные ферменты, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как люминол; биолюминесцентные материалы, такие как люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, такие как радиоактивное серебро-111, радиоактивное серебро-199, бисмут²¹³, иод (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), технеций

(⁹⁹Tc), таллий (²⁰¹Tl), галлий (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), палладий (¹⁰³Pd), молибден (⁹⁹Mo), ксенон (¹³³Xe), фтор (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn и ¹¹⁷Tin; позитронно-активные металлы с применением различных вариантов позитронно-эмиссионной томографии; нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов; и молекулы, которые являются радиоактивно мечеными или конъюгированными со специфичными радиоактивными изотопами.

Присоединение радиоактивных изотопов к антителам можно осуществить посредством общепринятых бифункциональных хелатов. Для присоединения радиоактивного серебра-111 и радиоактивного серебра-199 можно применять линкеры на основе серы. См. публикацию Hazra et al., *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Присоединение радиоактивных изотопов серебра может включать восстановление иммуноглобулина аскорбиновой кислотой. Для радиоактивных изотопов, таких как ¹¹¹In и ⁹⁰Y, можно применять ибритутумаб тиуксетан, который будет вступать в реакцию с такими изотопами с образованием ¹¹¹In-ибритутумаба тиуксетана и ⁹⁰Y-ибритутумаба тиуксетана соответственно. См. публикацию Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl:S91-S95(2001).

Терапевтические фрагменты, другие белки, другие антитела и/или обнаруживаемые метки могут быть объединены или конъюгированы напрямую или опосредованно с применением посредника (например, линкера) с антителом согласно настоящему изобретению. См., например, публикации Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985); и Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Подходящие линкеры включают, например, отщепляемые и неотщепляемые линкеры. Можно применять различные линкеры, которые высвобождают присоединенные терапевтические агенты, белки, антитела и/или обнаруживаемые метки в кислых или восстанавливающих условиях, при воздействии специфичных протеаз или при других определенных условиях.

VI. Фармацевтические композиции и способы применения.

При профилактических вариантах применения антитело или средство для индукции антитела или фармацевтическую композицию, содержащую антитело или средство, вводят пациенту, predisposed или иным способом подверженному риску развития заболевания (например, болезни Альцгеймера), в режиме (дозе, частоте и пути введения), эффективном для снижения риска, уменьшения тяжести или отсрочивания манифестации по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В частности, режим, предпочтительно, является эффективным для ингибирования или отсрочивания тау или фосфо-тау и спаренных волокон, образованных из них, в головном мозге, и/или ингибирования или отсрочивания их токсичных эффектов, и/или ингибирования/или отсрочивания развития поведенческого дефицита. При терапевтических вариантах применения антитело или средство для индукции антитела вводят пациенту, predisposed к заболеванию или уже страдающему от заболевания (например, болезни Альцгеймера), в режиме (дозе, частоте и пути введения), эффективном для облегчения или по меньшей мере ингибирования дальнейшего ухудшения по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В частности, режим, предпочтительно, является эффективным для снижения или по меньшей мере ингибирования дальнейшего повышения уровней тау, фосфо-тау или спаренных волокон, образованных из них, связанной токсичности и/или поведенческого дефицита.

Режим считают терапевтически или профилактически эффективным, если индивидуальный пациент, получающий лечение, достигает более благоприятного исхода, чем средний исход в контрольной популяции сравнимых пациентов, которые не получали лечение способами согласно настоящему изобретению, или если у получавших лечение пациентов наблюдается более благоприятный исход по сравнению с контрольными пациентами в контролируемом клиническом исследовании (например, исследовании фазы II, фазы II/III или фазы III) при уровне $p < 0,05$ или $0,01$, или даже $0,001$.

Эффективные дозы варьируют в зависимости от множества различных факторов, таких как способы введения, сайт-мишень, физиологическое состояние пациента, представляет ли собой пациент носителя APOE, представляет ли собой пациент человека или животное, другие вводимые лекарственные препараты, является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

Иллюстративные диапазоны доз для антител составляют от приблизительно $0,01$ до 60 мг/кг, или от приблизительно $0,1$ до 3 мг/кг, или $0,15 - 2$ мг/кг, или $0,15 - 1,5$ мг/кг массы тела пациента. Антитело можно вводить в таких дозах ежедневно, через день, еженедельно, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в три месяца или согласно любому другому расписанию, определенному посредством эмпирического анализа. Иллюстративное лечение предусматривает введение в нескольких дозах в течение длительного периода времени, например, по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные иллюстративные режимы лечения предусматривают введение один раз в две недели, или один раз в месяц, или один раз в 3 - 6 месяцев.

Количество средства для активного введения варьирует от 0,1 - 500 мкг на пациента и, более часто, от 1 - 100 или 1-10 мкг на инъекцию для введения человеку. Время между введением инъекций может варьировать в значительной степени от одного раза в день до одного раза в год, до одного раза в десять лет. Типичный режим состоит из иммунизации с последующими бустер-инъекциями через интервалы времени, такие как интервалы 6 недель или два месяца. Другой режим состоит из иммунизации с последующими бустер-инъекциями через 1, 2 и 12 месяцев. Другой режим предусматривает инъекцию один раз в два месяца в течение жизни. В качестве альтернативы, бустер-инъекции можно вводить нерегулярно, как показано на основании мониторинга иммунного ответа.

Антитела или средства для индукции антител предпочтительно вводят периферическим путем (т.е. единица, в которой вводят или которая индуцирует антитело, пересекает гематоэнцефалический барьер для достижения предназначенного участка в головном мозге). Пути введения включают местный, внутривенный, пероральный, подкожный, внутриартериальный, внутричерепной, интратекальный, интраперитонеальный, интраназальный, внутриглазной или внутримышечный. Предпочтительными путями введения антител являются внутривенный и подкожный. Предпочтительными путями для активной иммунизации являются подкожный и внутримышечный. Данный тип инъекции наиболее часто осуществляют в мышцы плеча или ноги. В некоторых способах средства инъецируют непосредственно в конкретную ткань, в которой накопились отложения, например, посредством внутричерепной инъекции.

Фармацевтические композиции для парентерального введения, предпочтительно, являются стерильными и по существу изотоническими, и их производят в условиях GMP (Good manufacturing practices, надлежащей производственной практики). Фармацевтические композиции могут быть предложены в единичной дозированной форме (т.е. дозе для однократного введения). Фармацевтические композиции можно приготовить в состав с применением одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ или вспомогательных средств. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекции антитела можно приготовить в состав в водных растворах, предпочтительно, в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой раствор или ацетатный буфер (для снижения неприятных ощущений в участке инъекции). Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. В качестве альтернативы, антитела могут находиться в лиофилизованной форме для восстановления перед применением подходящим наполнителем, например, стерильной апиrogenной водой.

Режимы согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с другим средством, эффективным при лечении или профилактике заболевания, лечение которого проводят. Например, в случае болезни Альцгеймера режимы согласно настоящему изобретению можно сочетать с иммунотерапией против Аβ (WO/2000/072880), ингибиторами холинэстеразы или мемантином, или в случае болезни Паркинсона - с иммунотерапией против альфа-синуклеина WO/2008/103472, леводопой, агонистами дофамина, ингибиторами COMT, ингибиторами MAO-B, амантадином или антихолинэргическими средствами.

Антитела вводят в эффективном режиме, что означает дозу, путь введения и частоту введения, которые отсрочивают манифестацию, уменьшают тяжесть, ингибируют дальнейшее ухудшение и/или облегчают по меньшей мере один признак или симптом нарушения, лечение которого проводят. Если пациент уже страдает от нарушения, режим могут называть терапевтически эффективным режимом. Если пациент подвержен повышенному риску развития нарушения по сравнению с общей популяцией, но пока не испытывает симптомов, режим могут называть профилактически эффективным режимом. В некоторых случаях терапевтическую или профилактическую эффективность можно продемонстрировать у индивидуального пациента по сравнению с историческими контролями или прошлым опытом того же пациента. В других случаях терапевтическую или профилактическую эффективность можно продемонстрировать в доклиническом или клиническом исследовании на популяции получающих лечение пациентов по сравнению с контрольной популяцией не получающих лечение пациентов.

Иллюстративные дозы антитела составляют 0,1 - 60 мг/кг (например, 0,5, 3, 10, 30 или 60 мг/кг), или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5 мг/кг), или 10 - 4000 мг либо 10 - 1500 мг в виде фиксированной дозы. Доза зависит от состояния пациента и ответа на предшествующее лечение, в случае его наличия, от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим, и от того, является ли нарушение острым или хроническим, помимо других факторов.

Введение может являться парентеральным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутричерепным, интратекальным, интраперитонеальным, местным, интраназальным или внутримышечным. Некоторые антитела можно вводить в системное кровообращение посредством внутривенного или подкожного введения. Внутривенное введение можно осуществлять, например, посредством инфузии в течение периода времени, такого как 30-90 мин.

Частота введения зависит от периода полужизни антитела в сосудистом русле, состояния пациента и пути введения, помимо других факторов. Частота может представлять собой введение ежедневно, еженедельно, один раз в месяц, один раз в три месяца или введение с нерегулярными интервалами в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирование нарушения, лечение которого проводят. Иллюст-

ративная частота для внутривенного введения составляет от введения еженедельно до одного раза в три месяца в течение непрерывного курса лечения, несмотря на то, что также возможно более или менее частое введение доз. Для подкожного введения иллюстративная частота введения доз составляет от введения ежедневно до одного раза в месяц, несмотря на то, что также возможно более или менее частое введение доз.

Количество вводимых доз зависит от того, является ли нарушение острым или хроническим, и от ответа нарушения на лечение. В случае острых нарушений или острых обострений хронического нарушения часто достаточными являются от 1 до 10 доз. Иногда одна болюсная доза, необязательно разделенная, является достаточной в случае острого нарушения или острого обострения хронического нарушения. Лечение можно повторять в случае повторного появления острого нарушения или острого обострения. В случае хронических нарушений антитело можно вводить с регулярными интервалами, например, еженедельно, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в три месяца, один раз в шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет, или в течение жизни пациента.

А. Способы диагностики и мониторинга.

Способы визуализации, диагностики *in vivo* и оптимизации иммунотерапии.

В настоящем изобретении предложены способы визуализации отложений тау-белка (например, нейрофибриллярных клубков и включений тау) у пациента *in vivo*. Способы осуществляют посредством введения реагента, такого как антитело, которое связывается с тау (например, мышиное, гуманизованное, химерное или венерованное 3D6 антитело), пациенту, и затем посредством обнаружения агента после его связывания. Антитела, связывающиеся с эпитопом тау-белка в пределах остатков аминокислот 199-213 или 262-276 SEQ ID NO: 3 (соответствующих аминокислотным остаткам 257-271 или 320-334 в SEQ ID NO: 1) или в пределах остатков аминокислот 259-268 или 290-299 или 321-330 или 353-362 в SEQ ID NO: 1 являются предпочтительными. В некоторых способах антитело связывается с эпитопом в пределах остатков аминокислот 199-213 SEQ ID NO: 3 (соответствующих аминокислотным остаткам 257-271 в SEQ ID NO: 1) или в пределах аминокислот 262-276 в SEQ ID NO: 3 (соответствует аминокислотным остаткам 320-334 в SEQ ID NO: 1). В некоторых способах антитело связывается с эпитопом в пределах остатков аминокислот 259-268 в SEQ ID NO: 1, в пределах аминокислот 290-299 в SEQ ID NO: 1, в пределах аминокислот в 321-330 SEQ ID NO: 1 или в пределах аминокислот в 353-362 SEQ ID NO: 1. Клирингового ответа на введенные антитела можно избежать или его можно снизить с применением фрагментов антитела, в которых отсутствует полноразмерная константная область, таких как Fab. В некоторых способах одно и то же антитело может выступать в качестве реактива как для лечения, так и для диагностики.

Диагностические реактивы можно вводить посредством внутривенной инъекции в организм пациента либо непосредственно в головной мозг с помощью внутричерепной инъекции или посредством сверления отверстия в черепе. Доза реактива должна находиться в тех же диапазонах, как и для способов лечения. Как правило, реактив является меченым, несмотря на то, что в некоторых способах первичный реактив с аффинностью в отношении тау является немеченым, и для связывания с первичным реактивом применяют вторичное средство мечения. Выбор метки зависит от способов обнаружения. Например, флуоресцентная метка является подходящей для оптического обнаружения. Применение парамагнитных меток является подходящим для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки можно также обнаружить с применением позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

Способы визуализации отложений тау-белка *in vivo* являются подходящими для диагностики или подтверждения диагноза таупатии, такой как болезнь Альцгеймера, лобно-височная лобарная дегенерация, прогрессирующий надъядерный паралич и болезнь Пика, или предрасположенности к такому заболеванию. Например, способы можно применять в отношении пациента, у которого наблюдаются симптомы деменции. Если у пациента присутствуют аномальные нейрофибриллярные клубки, тогда пациент, вероятно, страдает от болезни Альцгеймера. В качестве альтернативы, если у пациента присутствуют аномальные включения тау, тогда, в зависимости от расположения включений, пациент может страдать от лобно-височной лобарной дегенерации. Способы можно также применять в отношении бессимптомных пациентов. Присутствие отложений аномального тау-белка свидетельствует о предрасположенности к последующему симптоматическому заболеванию. Способы также являются подходящими для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение у пациентов, у которых ранее было диагностировано вызванное тау заболевание.

Диагностику можно осуществлять посредством сравнения количества, размера и/или интенсивности меченого локуса с соответствующими исходными значениями. Исходные значения могут представлять собой средние уровни в популяции не страдающих от заболевания индивидуумов. Исходные значения могут также представлять собой предшествующие уровни, определенные у того же пациента. Например, исходные значения можно определить у пациента до начала лечения иммунотерапией тау, а после этого измеренные значения сравнить с исходными значениями. Снижение значений по сравнению с исходным уровнем свидетельствует о положительном ответе на лечение.

У некоторых пациентов диагностику таупатии можно облегчить посредством осуществления ска-

нирования ПЭТ. Сканирование ПЭТ можно осуществить с применением, например, общепринятого аппарата для визуализации ПЭТ и вспомогательного оборудования. Сканирование, как правило, охватывает одну или более областей головного мозга, которые, как известно, обычно связаны с отложениями тау-белка, и одну или более областей, в которых, как правило, присутствует небольшое количество, в случае наличия, отложений, и которые выступают в качестве контролей.

Сигнал, обнаруженный при сканировании ПЭТ, можно представить в виде многомерного изображения. Многомерное изображение может быть представлено в двух измерениях, представляющих собой поперечное сечение головного мозга, в трех измерениях, представляющих собой трехмерный головной мозг, или в четырех измерениях, представляющих собой изменения в трехмерном головном мозге в течение времени. Можно применять колориметрическую шкалу с различными цветами, указывающими на различные количества метки, и логически выведенное обнаруженное отложение тау-белка. Результаты сканирования можно также представить в числовом выражении с цифрами, относящимися к обнаруженному количеству метки, и, как следствие, количеству отложений тау-белка. Метку, присутствующую в области головного мозга, которая, как известно, связана с отложениями в случае конкретной таупатии (например, болезни Альцгеймера), можно сравнить с меткой, присутствующей в области, которая, как известно, не связана с отложениями, для получения соотношения, свидетельствующего о степени отложений в первой области. Для одного и того же радиоактивно меченого лиганда такие соотношения обеспечивают сопоставимый показатель отложений тау-белка и его изменений между различными пациентами.

В некоторых способах сканирование ПЭТ проводят одновременно или в ходе того же визита пациента, что и сканирование МРТ (магнитно-резонансной томографии) или КТ (компьютерной томографии). Сканирование МРТ или КТ позволяет получить больше информации об анатомических деталях головного мозга, чем сканирование ПЭТ. Однако изображение от сканирования ПЭТ можно наложить на изображение от сканирования МРТ или КТ, чтобы более точно указать расположение лиганда ПЭТ и логически выведенных отложений тау по сравнению с анатомическими структурами в головном мозге. Некоторые приборы могут осуществлять как сканирование ПЭТ, так и сканирование МРТ или КТ без изменения положения пациента между сканированием, что облегчает наложение изображений.

Подходящие лиганды ПЭТ включают меченные радиоактивной меткой антитела согласно настоящему изобретению (например, антитело 3D6 мыши, гуманизированное, химерное или венированное антитело 3D6). Используемый радиоактивный изотоп может представлять собой, например, C^{11} , N^{13} , O^{15} , F^{18} или I^{123} . Интервал между введением лиганда ПЭТ и осуществлением сканирования может зависеть от лиганда ПЭТ и, в частности, его скорости поглощения и клиренса в головной мозг, а также периода полужизни его радиоактивной метки.

Сканирование ПЭТ можно также осуществлять в качестве профилактической меры у бессимптомных пациентов или пациентов, у которых наблюдаются симптомы легкого когнитивного нарушения, но которым еще не был поставлен диагноз таупатии, которые, однако, подвержены повышенному риску развития таупатии. В случае бессимптомных пациентов сканирование является в особенности подходящим для индивидуумов, которые, как считают, подвержены повышенному риску развития таупатии в связи с семейным анамнезом, генетическими или биохимическими факторами риска или зрелым возрастом. К профилактическому сканированию можно приступать, например, у пациентов в возрасте от 45 до 75 лет. У некоторых пациентов первое сканирование проводят в возрасте 50 лет.

Профилактическое сканирование можно осуществлять с интервалами, например, от шести месяцев до десяти лет, предпочтительно, 1-5 лет. У некоторых пациентов профилактическое сканирование проводят ежегодно. Если сканирование ПЭТ, проведенное в качестве профилактической меры, свидетельствует об аномально высоких уровнях отложений тау-белка, можно начинать применение иммунотерапии и проводить последующие сканирования ПЭТ, как для пациентов, у которых была диагностирована таупатия. Если сканирование ПЭТ, проведенное в качестве профилактической меры, свидетельствует об уровнях отложений тау-белка в пределах нормы, можно проводить последующие сканирования ПЭТ с интервалами от шести месяцев до десяти лет, предпочтительно, 1-5 лет, как и ранее, либо в ответ на появление признаков и симптомов таупатии или легкого когнитивного нарушения. Посредством сочетания профилактического сканирования с введением направленной на тау иммунотерапии, если и когда были обнаружены отложения тау-белка выше нормального уровня, уровни отложений тау-белка можно снизить до нормальных уровней или близко к ним, или по меньшей мере ингибировать их повышение в дальнейшем, и пациент может оставаться свободным от таупатии в течение более длительного периода времени, чем в случае, если он не получает профилактическое сканирование и направленную на тау иммунотерапию (например, по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 лет, или в течение оставшейся жизни пациента).

Нормальные уровни отложений тау-белка можно определить на основании количества нейрофибриллярных клубков или включений тау в головном мозге репрезентативного образца от индивидуумов в общей популяции, у которых не была диагностирована конкретная таупатия (например, болезнь Альцгеймера) и которые, как считают, не подвержены повышенному риску развития такого заболевания (например, репрезентативный образец не страдающих от заболевания индивидуумов в возрасте до 50 лет). В качестве альтернативы, нормальный уровень можно определить у индивидуального пациента, если сиг-

нал ПЭТ в соответствии со способами согласно настоящему изобретению в области головного мозга, в которой, как известно, развиваются отложения тау-белка, не отличается (в пределах точности измерения) от сигнала из области головного мозга, в которой, как известно, такие отложения в норме не развиваются. Повышенный уровень у индивидуума можно определить посредством сравнения с нормальными уровнями (например, за пределами среднего значения и вариации стандартного отклонения) или просто на основании повышенного сигнала за пределами погрешности эксперимента в области головного мозга, связанной с отложениями тау-белка, по сравнению с областью, которая, как известно, не связана с отложениями. С целью сравнения уровней отложений тау-белка у индивидуума и популяции отложения тау-белка, предпочтительно, должны быть определены в одной и той же области или областях головного мозга, причем данные области включают по меньшей мере одну область, в которой, как известно, образуются отложения тау-белка, связанные с конкретной таупатией (например, болезнью Альцгеймера). Пациент, у которого наблюдается повышенный уровень отложений тау-белка, является кандидатом для начала иммунотерапии.

После начала иммунотерапии снижение уровня отложений тау-белка можно сначала наблюдать как свидетельство того, что лечение производит желаемый эффект. Наблюдаемое снижение может находиться, например, в диапазоне 1 - 100%, 1 - 50% или 1 - 25% от исходного значения. Такие эффекты можно измерять в одной или нескольких областях головного мозга, в которых, как известно, образуются отложения, или можно измерять из среднего значений таких областей. Суммарный эффект лечения можно приблизительно вычислить посредством добавления процента снижения по сравнению с исходным уровнем к повышению отложений тау-белка, которое в противном случае произойдет у среднего не получавшего лечение пациента.

Сохранение отложений тау-белка на приблизительно постоянном уровне или даже незначительное увеличение отложений тау-белка может также свидетельствовать об ответе на лечение, пусть даже и субоптимальном ответе. Такие ответы можно сравнить с временной динамикой уровней отложений тау-белка у пациентов с конкретной таупатией (например, болезнью Альцгеймера), которые не получают лечение, для определения того, производит ли иммунотерапия эффект в отношении ингибирования последующего повышения отложений тау-белка.

Мониторинг изменений отложений тау-белка позволяет откорректировать иммунотерапию или другой режим лечения в ответ на лечение. Мониторинг ПЭТ обеспечивает указание на природу и степень ответа на лечение. Затем можно определить, нужно ли корректировать лечение, и в случае необходимости лечение можно откорректировать в ответ на мониторинг ПЭТ. Таким образом, мониторинг ПЭТ позволяет откорректировать направленную на тау иммунотерапию или другой режим лечения до того, как другие биомаркеры, МРТ или когнитивные показатели продемонстрировали обнаруживаемые ответы. Значительное изменение означает, что сравнение значения параметра после лечения по сравнению с исходным уровнем обеспечивает некоторое доказательство, что лечение привело или не привело к благоприятному эффекту. В некоторых случаях изменение значений параметра у пациента само по себе обеспечивает доказательство, что лечение привело или не привело к благоприятному эффекту. В других случаях изменение значений, в случае наличия, у пациента сравнивают с изменением значений, в случае наличия, в репрезентативной контрольной популяции пациентов, которые не получали иммунотерапию. Разница между ответом конкретного пациента и нормальным ответом контрольного пациента (например, среднее значение плюс дисперсия стандартного отклонения) может также обеспечить доказательство, что режим иммунотерапии достиг благоприятного эффекта для пациента или не достиг его.

У некоторых пациентов мониторинг свидетельствует об обнаруживаемом снижении отложений тау-белка, но данный уровень отложений тау-белка остается выше нормального. Для таких пациентов, если неприемлемые побочные эффекты отсутствуют, режим лечения можно продолжить без изменений или даже с увеличением частоты введения и/или дозы, если лечение уже не проводят при максимальной рекомендуемой дозе.

Если мониторинг свидетельствует об уровнях отложений тау-белка у пациента, которые уже были снижены до нормальных уровней или находятся вблизи от нормальных уровней отложений тау-белка, режим иммунотерапии можно откорректировать с такового для индукции (т.е. который снижает уровень отложений тау-белка) к таковому для сохранения (т.е. который поддерживает отложения тау-белка на приблизительно постоянном уровне). На такой режим можно влиять посредством снижения дозы и/или частоты введения иммунотерапии.

У других пациентов мониторинг может свидетельствовать, что иммунотерапия характеризуется некоторым благоприятным эффектом, но субоптимальным эффектом. Оптимальный эффект можно определить как процент снижения уровня отложений тау-белка в пределах верхней половины или квартиля изменения отложений тау-белка (измеренного или рассчитанного для всего головного мозга или его репрезентативной области или областей, в которых, как известно, образуются отложения тау-белка), наблюдаемого в репрезентативном образце от пациентов, страдающих от таупатии, которые получают иммунотерапию в данную временную точку после начала терапии. Пациента, который испытывает меньшее снижение, или пациента, отложения тау-белка у которого остаются постоянными или даже повышаются, но в меньшей степени, чем ожидается при отсутствии иммунотерапии (например, как измерено в контроль-

ной группе пациентов, которым не вводят иммунотерапию), можно классифицировать как демонстрирующего положительный, но субоптимальный ответ. Таким пациентам можно необязательно откорректировать режим, при этом увеличивая дозу и/или частоту введения средства.

У некоторых пациентов отложения тау-белка могут повышаться в аналогичной или большей степени по сравнению с отложениями тау у пациентов, которые не получают иммунотерапию. Если такое повышение продолжается в течение периода времени, такого как 18 месяцев или 2 года, даже после любого повышения частоты или дозы средства, иммунотерапию можно при необходимости прекратить в пользу других вариантов лечения.

Вышеупомянутое описание диагностики, мониторинга и корректировки лечения таупатий, главным образом, сфокусировано на применении сканирования ПЭТ. Однако для осуществления таких способов можно применять любую другую методику для визуализации и/или измерения отложений тау-белка, подходящую для применения с антителами против тау согласно настоящему изобретению (например, антителом мыши, гуманизированным, химерным или венеризованным антителом 3Dб), вместо сканирования ПЭТ.

Также предложены способы обнаружения иммунного ответа против тау у пациента, страдающего от или предрасположенного к заболеваниям, связанным с тау. Способы можно применять для мониторинга течения терапевтического и профилактического лечения средствами, предложенными в настоящем документе. Профиль антитела после пассивной иммунизации, как правило, демонстрирует быстрый пик концентрации антитела с последующим экспоненциальным спадом. При отсутствии следующей дозы спад достигнет уровней до начала лечения в течение периода времени длительностью от дней до месяца в зависимости от периода полужизни вводимого антитела. Например, период полужизни некоторых антител человека составляет порядка 20 дней.

В некоторых способах измерение антитела против тау на исходном уровне у субъекта проводят до введения, второе измерение проводят вскоре после этого для определения пикового уровня антитела, и одно или более последующих измерений проводят через интервалы времени для мониторинга снижения уровней антитела. Когда уровень антитела снизился до исходного уровня или заранее определенного процента пика менее исходного уровня (например, 50%, 25% или 10%), проводят введение следующей дозы антитела. В некоторых способах пиковые или последующие измеренные уровни менее фонового уровня сравнивают с эталонными уровнями, ранее определенными, чтобы составить благоприятный режим профилактического или терапевтического лечения для других субъектов. Если измеренный уровень антитела является в значительной степени меньшим, чем эталонный уровень (например, меньшим, чем среднее значение минус одно или, предпочтительно, два стандартных отклонения от эталонного значения в популяции субъектов, получающих пользу от лечения), показано введение дополнительной дозы антитела.

Также предложены способы обнаружения тау у субъекта, например, посредством измерения тау в образце от субъекта или посредством визуализации тау у субъекта *in vivo*. Такие способы являются подходящими для диагностики или подтверждения диагноза заболеваний, связанных с тау, или предрасположенности к указанным заболеваниям. Способы можно также применять в отношении бессимптомных субъектов. Присутствие тау свидетельствует о предрасположенности к будущему симптоматическому заболеванию. Способы также являются подходящими для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение у субъектов, у которых ранее была диагностирована болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), глобулярная глиальная таупатия (GGT) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

Можно осуществить контакт биологических образцов, полученных от субъекта, страдающего, как подозревают, страдающего, или подверженного риску развития болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), глобулярной глиальной таупатии (GGT) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), с антителами, раскрытыми в настоящем документе, для оценки присутствия тау. Например, уровни тау у таких субъектов можно сравнить с таковыми, присутствующими у здоровых субъектов. В качестве альтернативы, уровни тау у таких субъектов, которые получают лечение заболевания, можно сравнить с таковыми субъектов, которые не получали лечение болезни Альцгеймера, синдрома Дауна,

легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), глобулярной глиальной таупатии (GGT) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП). Некоторые такие исследования включают биопсию ткани, полученной от таких субъектов. Анализы ELISA могут также являться подходящими способами, например, для оценки тау в жидких образцах.

VII. Наборы.

В настоящем изобретении также предложены наборы (например, контейнеры), содержащие антитела, раскрытые в настоящем документе, и сопутствующие материалы, такие как инструкции по применению (например, листок-вкладыш). Инструкции по применению могут содержать, например, инструкции по введению антитела и необязательно одного или нескольких дополнительных средств. Контейнеры антител могут представлять собой дозы на один прием, упаковки большого объема (например, многодозовые упаковки), или дозы, меньшие, чем доза на один прием.

Листок-вкладыш означает инструкции, которые обычно вкладывают в коммерческие упаковки терапевтических продуктов и которые содержат информацию относительно показаний, применения, дозы, введения, противопоказаний и/или предостережений относительно применения таких терапевтических продуктов.

Наборы могут также содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (bacteriostatic water for injection, BWFI), фосфатно-буферный солевой раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Наборы могут также содержать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и точки зрения потребителя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

VIII. Другие варианты применения.

Антитела можно применять для обнаружения тау или его фрагментов в контексте клинической диагностики или лечения, или в исследованиях. Например, антитела можно применять для обнаружения присутствия тау в биологическом образце как свидетельства того, что биологический образец содержит отложения тау. Связывание антител с биологическим образцом можно сравнить со связыванием антител с контрольным образцом. Контрольный образец и биологический образец могут содержать клетки, которые происходят из одной ткани. Контрольные образцы и биологические образцы можно получить от одного индивидуума или различных индивидуумов одновременно или в различные периоды времени. При необходимости, несколько биологических образцов и несколько контрольных образцов оценивают в различные периоды времени для защиты от случайной вариации вне зависимости от различий между образцами. Затем можно провести прямое сравнение между биологическим образцом или образцами и контрольным образцом или образцами для определения того, увеличено, снижено или является аналогичным связывание антитела (т.е. присутствие тау) с биологическим образцом или образцами по сравнению со связыванием антитела с контрольным образцом или образцами. Увеличенное связывание антитела с биологическим образцом или образцами по сравнению с контрольным образцом или образцами свидетельствует о присутствии тау в биологическом образце или образцах. В некоторых случаях увеличенное связывание антитела является статистически значимым. Необязательно, связывание антитела с биологическим образцом по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз или 100 раз выше, чем связывание антитела с контрольным образцом.

Помимо этого, антитела можно применять для обнаружения присутствия тау в биологическом образце для мониторинга и оценки эффективности терапевтического средства, которое применяют для лечения пациента, у которого была диагностирована болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), глобулярная глиальная таупатия (GGT) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). Биологический образец от пациента, у которого была диагностирована болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), глобулярная

глиальная таупатия (GGT) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), оценивают для установления исходного уровня связывания антител с образцом (т.е. исходного уровня присутствия тау в образце) до начала терапии терапевтическим средством. В некоторых случаях несколько биологических образцов от пациента оценивают в различные периоды времени для установления как исходного уровня, так и показателя случайной вариации, не зависящей от лечения. Затем терапевтическое средство вводят в режиме. Режим может включать несколько введений средства в течение периода времени. Необязательно, связывание антител (т.е. присутствие тау) оценивают в различные периоды времени в нескольких биологических образцах от пациента как для установления показателя случайной вариации, так и для демонстрации тенденции ответа на иммунотерапию. Затем сравнивают различные оценки связывания антитела с биологическими образцами. Если проводят только две оценки, можно провести прямое сравнение между двумя оценками для определения того, увеличено, снижено или остается аналогичным связывание антитела (т.е. присутствие тау) между двумя оценками. Если проводят более двух измерений, измерения можно проанализировать во временной динамике, начиная от момента до лечения терапевтическим средством и продолжая в течение курса терапии. В случае пациентов, у которых снизилось связывание антитела с биологическими образцами (т.е. присутствие тау), будет сделано заключение, что терапевтическое средство было эффективным при лечении болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), глобулярной глиальной таупатии (GGT) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП) у пациента. Снижение связывания антитела может являться статистически значимым. Необязательно, связывание снижается по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. Оценку связывания антитела можно проводить в сочетании с оценкой других признаков и симптомов болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), глобулярной глиальной таупатии (GGT) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП).

Антитела можно также применять в качестве исследовательских реактивов для лабораторного исследования при обнаружении тау или его фрагментов. В таких вариантах применения антитела можно пометить флуоресцентными молекулами, спин-меченными молекулами, ферментами или радиоактивными изотопами, и можно предложить в форме набора со всеми необходимыми реактивами для проведения анализа обнаружения. Антитела можно также применять для очистки тау или партнеров связывания тау, например, методом аффинной хроматографии.

Все патенты, веб-сайты, другие публикации, учетные номера и т.п., ссылки на которые содержатся выше или ниже, полностью включены посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждый из данных документов был конкретно и индивидуально указан как включенный посредством ссылки. Если различные версии последовательности связаны с учетным номером в разное время, то подразумевается версия, связанная с учетным номером на действительную дату подачи данной заявки. Действительная дата подачи заявки означает более раннюю из действительной даты подачи или даты подачи приоритетной заявки, ссылающейся на учетный номер, если это применимо. Аналогично, если различные версии публикации, веб-сайта или т.п. опубликованы в разное время, то подразумевается версия, опубликованная самой последней на действительную дату подачи заявки, если не указано обратное. Любой признак, стадия, элемент, вариант реализации или аспект настоящего изобретения можно применять в комбинации с любым другим, если специально не указано обратное. Несмотря на то, что настоящее изобретение описано достаточно подробно при помощи иллюстрации и примера с целью ясности и понимания, будет очевидно, что некоторые изменения и модификации могут быть произведены в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Идентификация моноклональных антител против тау.

Моноклональные антитела против тау получали следующим образом. Иммунизации проводили с применением либо рекомбинантного тау человека размером 383 а.к., аминокислот (4R0N), с присоединением His-метки на N-конце, содержащего мутацию P301S [иммуноген А], либо рекомбинантного тау человека размером 383 а.к. (4R0N), содержащего мутацию P301S, в котором отсутствовала N-концевая His-метка [иммуноген В]. Иммуногены эмульгировали в адьюванте RIBI.

Самок мышей Balb/c в возрасте пять недель иммунизировали интраперитонеальным способом по 25 мкг иммуногена А в день 0 и по 10 мкг иммуногена А в каждый из дней 7, 14, 21, 27, 34, 48, 55 и 62. Мышей иммунизировали по 10 мкг иммуногена В в дни 76 и 90. В дни 43 и 98 у мышей отбирали кровь и титровали против иммуногена А; в день 101 животным с наивысшими титрами вводили бустер-инъекцию посредством конечной иммунизации 50 мкг иммуногена В, который доставляли $1/2$ интраперитонеальным способом и $1/2$ внутривенным способом. Проводили скрининг слитых гибридом посредством ELISA против обоих иммуногенов, и у положительных животных с наивысшим сигналом проводили картирование эпитопа (см. пример 2). 3D6 вступало в реакцию с пептидами, соответствующими остаткам аминокислот 199 - 213 SEQ ID NO: 3 и остаткам аминокислот 262 - 276 SEQ ID NO: 3 (согласно нумерации самой длинной в ЦНС изоформы тау, это соответствует остаткам аминокислот 257 - 271 SEQ ID NO: 1 и остаткам аминокислот 320 - 334 SEQ ID NO: 1).

Пример 2. Картирование эпитопа антитела 3D6.

Для картирования антитела 3D6 мыши применяли диапазон перекрывающихся биотинилированных пептидов, охватывающих весь тау-белок человека 4R0N размером 383 а.к. Дополнительные пептиды применяли для моделирования потенциальных посттрансляционных модификаций C- и N-терминальных концов белка.

Биотинилированные пептиды присоединяли к отдельным лункам планшета для ELISA, сенсibilизированного стрептавидином. Планшет блокировали и обрабатывали 3D6 мыши с последующей инкубацией с конъюгированным с пероксидазой хрена антителом против иммуноглобулинов мыши. После тщательной промывки на планшет наносили OPD и позволяли реакции развиваться. Считывание на планшетах проводили при поглощении 450 нм. Вычитание фона проводили с использованием значений поглощения из лунок, не содержащих первичное антитело, и порог для положительного связывания устанавливали на уровне 0,2 единицы поглощения. Положительное связывание было обнаружено для пептида, охватывающего остатки аминокислот 199 - 213 (SEQ ID NO: 3) и остатки аминокислот 262 - 276 (SEQ ID NO: 3). С применением нумерации полноразмерного тау-белка человека 4R2N (441 аминокислот) данные пептиды соответствуют остаткам аминокислот 257 - 271 (SEQ ID NO: 1) и 320 - 334 (SEQ ID NO: 1). (фиг. 1).

Пример 3. Дизайн гуманизованных антител 3D6.

Исходной точкой или донорным антителом для гуманизации являлось антитело 3D6 мыши. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи зрелого m3D6 представлена в виде SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи зрелого m3D6 представлена в виде SEQ ID NO: 11. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно сводному определению Кэбота/Чотиа представлены в виде SEQ ID NO: 8-10 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи согласно Кэботу представлены в виде SEQ ID NO: 12-14 соответственно. Везде применяют нумерацию Кэбота.

Вариабельная область каппа (Vk) 3D6 принадлежит к подгруппе 2 мыши согласно Кэботу, которая соответствует подгруппе 2 человека согласно Кэботу, и вариабельная область тяжелой цепи (Vh) принадлежит к подгруппе 2с мыши согласно Кэботу, которая соответствует подгруппе 1 человека согласно Кэботу [Kabat E.A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242]. CDR-L1 согласно Чотиа из 16 остатков принадлежит к каноническому классу 4, CDR-L2 согласно Чотиа из 7 остатков - классу 1, CDR-L3 согласно Чотиа из 9 остатков - классу 1 в Vk [Martin A.C, and Thornton J.M. (1996) J. Mol. Biol. 263:800-15. [Martin & Thornton, 1996]. CDR-H1 согласно Чотиа из 10 остатков принадлежит классу 1, CDR-H2 согласно Чотиа из 17 остатков - классу 2 [Martin & Thornton, 1996]]. CDR-H3 не содержит канонических классов. Проводили поиск среди последовательностей белков в базе данных PDB [Deshpande N, et al. (2005) Nucleic Acids Res. 33: D233-7.] для нахождения структур, которые будут обеспечивать примерную структурную модель 3D6. Для построения Fv модели 3D6 использовали структуру антитела Fab с#24 против пироглутамат-абета (pdb code 5MYX) [Piechotta, A. et al., 2017, J Biol Chem. 292: 12713-12724] с разрешением 1,4 А. Она сохраняет ту же каноническую структуру для петель, как и 3D6.

Каркасная область 3D6 VH имеет высокую степень сходства последовательностей с соответствующими областями гуманизованного 48G7 Fab PDB: 2RCS, разработанного Wedemayer, G.J., et al. (1997; Science 276: 1665-1669). Вариабельные домены 3D6 и 48G7 fab также имеют одинаковую длину петель для CDR-H1, H2. Аналогичным образом, каркасные области 3D6 VL обладают высокой степенью сходства последовательностей с соответствующими областями человеческого антитела ARX71335 VL, клонированного Dafferner, A.J., et al. (2017; Direct Submission). Вариабельный легкий домен антитела 3D6 и ARX71335 также имеет одинаковую длину для петель CDR-L1, L2 и L3. Соответственно, каркасные об-

ласти 48G7 VH (2RCS-VH) и ARX71335 VL были выбраны в качестве акцепторных последовательностей для CDR 3D6. Модель CDR 3D6, привитых к соответствующим человеческим каркасным областям для VH и VL, была построена и использовалась в качестве руководства для дальнейших обратных мутаций.

Варианты последовательностей тяжелой и легкой цепей, которые получили в результате процесса гуманизации антитела, затем выравнивали с последовательностями зародышевой линии человека с применением инструмента IMGT Domain GapAlign для оценки степени гуманизации тяжелой и легкой цепей, как изложено в руководствах комитета МНН ВОЗ. (WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review) (интернет) 2014. Доступно по адресу <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) Остатки заменяли для выравнивания с соответствующей последовательностью зародышевой линии человека, когда это возможно, для усиления степени гуманизации и для снижения потенциальной иммуногенности. Для гуманизованных вариантов VLvb2 и VLvb3 были введены мутации, чтобы сделать последовательности более схожими с геном человеческой зародышевой линии IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27). Для гуманизованных вариантов VHvb2, VHvb3, VHvb4, VHvb5, VHvb6 и VHvb6 мутации были введены, чтобы сделать последовательности более схожими с геном человеческой зародышевой линии IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25).

Версии hu3D6-VH и hu3D6-VL были разработаны для обеспечения возможности оценки различных каркасных остатков на предмет их вклада в связывание антигена, термостабильности и иммуногенности, и для оптимизации гликозилирования, агрегации, N-концевой гетерогенности, термостабильности, участков с обнаженным зарядом на поверхности, участков с обнаженным зарядом на поверхности, дезаминирования и чувствительности к протеиназе. Положения, рассматриваемые на предмет мутации, включают такие положения, которые:

определяют канонические конформации CDR (кратко изложено в Martin, A.C.R. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. In: Kontermann R and Dübel S (eds). *Antibody Engineering*. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG),

находятся в зоне Вернье (Foote J and Winter G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol.* 224(2):487-99),

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

чувствительны к посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование или пироглютаминирование,

заняты остатками, которые предположительно конфликтуют с CDR, в соответствии с моделью CDR 3D6, привитой на каркасные области VH и VL, или

заняты остатками, которые редко встречаются среди секвенированных человеческих антител, где либо родительский мышинный остаток 3D6, либо какой-либо другой остаток гораздо более распространен в спектре человеческих антител.

Выравнивания мышинных 3D6 и различных гуманизованных антител показаны для переменных областей легкой цепи (табл. 4 и фиг. 3) и переменных областей тяжелой цепи (табл. 3 и фиг. 2).

Конструировали 7 вариантов гуманизованной переменной области тяжелой цепи и 3 варианта гуманизованной переменной области легкой цепи, содержащие различные пермутации замен: hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6Hvb5, hu3D6VHvb6 или hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO: 76-80 и 90-91, соответственно); и hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2, или hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO: 83-85, соответственно) (табл. 3 и 4). Иллюстративные дизайны гуманизованных Vk и Vh с обратными мутациями и другими мутациями на основе отобранных каркасных областей человека представлены в табл. 3 и 4 соответственно. Выделенные жирным шрифтом области в табл. 3 и 4 отмечают CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа. SEQ ID NO: 76-80 и SEQ ID NO: 90-91 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в табл. 5. Аминокислоты в положениях в hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6 и hu3D6VHvb7 перечислены в табл. 6. Аминокислоты в положениях в hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2 и hu3D6VLvb3 перечислены в табл. 7.

Таблица 3

№ остатка согласно Кэботу	Линейный № остатка	FR или CDR	3D6 VH мыши (SEQ ID NO:7)	IMGT#IGHV1-69*2*01 (SEQ ID NO:25)	2RCS-VH_huFwvk (SEQ ID NO:75)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
1	1	Fr1	E	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	Q	Q	V	V	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	D	E	E	E	E	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	V	V	V	V	V	V	V	V
13	13	Fr1	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	L	T	S	S	S	T	T	T	T	T
18	18	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	I	L	L	I	I	I	I	I	I
21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	T	T	K	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	Y	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	N	N	N	N	T	T	T	T

29	29	CDR-H1	I	F	I	I	I	I	I	I	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	K	K	K	K	K	K	K	K
31	31	CDR-H1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
32	32	CDR-H1	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	L	M	M	L	L	L	L	L	L	L
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
35A		CDR-H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-
35B		CDR-H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	R	Q	K	K	R	R	R	R	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	R	R	R	R	R	R	R	R
41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	E	E	G	G	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	K	Q	Q	K	K	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	I	I	I	I	I	I	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L	R	W	W	W	W	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	V	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	CDR-H2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	54	CDR-H2	E	E	A	E	E	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	D	E	N	D	D	D	D	E	E	E
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	V	I	K	V	V	I	I	I	V	V
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	D	A	D	D	D	D	D	D	D	D
61	62	CDR-H2	P	E	P	P	P	P	P	P	P	P
62	63	CDR-H2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	K	K	R	R	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	A	A	A	A	V	V	V	V

68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
70	71	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	S	S	T	T	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D	N	N	D	D	D	D	D	D
77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M	L	L	L	M	M	M	M	M
81	82	Fr3	Q	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E
82	83	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	T	T	T	R	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	F	Y	Y	F	F	Y	Y	Y	F	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S
94	98	Fr3	T	T	S	T	T	T	T	T	T	T
95	99	CDR-H3	L		Y	L	L	L	L	L	L	L
96		CDR-H3	-		Y	-	-	-	-	-	-	-
97		CDR-H3	-		G	-	-	-	-	-	-	-
98		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
99		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100A		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100B		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100C		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100D		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100E		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100F		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100G		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100H		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100I		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100J		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100K		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
101	100	CDR-H3	D	Q	I	D	D	D	D	D	D	D
102	101	CDR-H3	F	H	Y	F	F	F	F	F	F	F
103	102	Fr4	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
105	104	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	105	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	T	L	T	T	L	L	L	L	L	L
109	108	Fr4	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Таблица 4

№ остатка согласно Кэботу	Линейный № остатка	FR или CDR	VL 3D6 мыши (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFvк (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLyb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLyb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLyb3 (SEQ ID NO:85)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	T	S	T	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	T	S	T	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	S	P	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V

14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	I	L	I	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	E
18	18	Fr1	P	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	R	K	K	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	V	L	L	L
27D	31	CDR-L1	D	Y	H	D	D	D
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1	-					
28	33	CDR-L1	D	N	D	D	D	D
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	K	K	N	K	K	K
31	36	CDR-L1	T	T	T	T	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	N	N	N	N	N	N
35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	L	L	F	L	L	L
37	42	Fr2	L	L	Q	L	L	Q
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	R	R	R	R	R	R
40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	K	K	R	K	K	R
46	51	Fr2	R	R	R	R	R	R
47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	L	L	K	L	L	L

51	56	CDR-L2	V	V	V	V	V	V
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	K	K	N	K	K	K
54	59	CDR-L2	L	L	R	L	L	L
55	60	CDR-L2	D	D	D	D	D	D
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	T	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	K	K	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	L	L	V	L	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	H	Y	H	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	W	E	M	W	W	W
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	G	G	G	G	G	G
92	97	CDR-L3	T	T	T	T	T	T
93	98	CDR-L3	H	H	H	H	H	H
94	99	CDR-L3	F	F	W	F	F	F
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95B		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95C		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95D		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95E		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	Y	L	Y	Y	Y	Y
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	A	Q	A	A	Q
101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	L	L	L	L	L
105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	L	I	L	I	I
106A	112	Fr4	K	K	K	K	K	K

Таблица 5
Обратные мутации и другие мутации V_H, V_L для гуманизованного 3D6

Вариант V _H или V _L	Экзон акцепторной последовательности V _H или V _L	Изменения по сравнению с остатками акцепторного каркасного участка (или CDR) (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа)
Hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	H91, H93, H94
Hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H67, H75, H76, H81, H91, H93, H94
Hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H91, H93, H94, H108, H109
Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82); IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27)	
Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82); IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27)	L7, L10, L15, L83, L86, L106
Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82); IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27)	L7, L10, L15, L17, L24, L37, L45, L83, L86, L100, L106

Таблица 6

Нумерация по Кэботу остатков каркасного участка (или CDR) (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 3D6

Остаток	2RCS-VH_huFrvk (SEQ ID NO:75)	(Тяжелая цепь)IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	3D6 мыши (SEQ ID NO:7)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
H1	Q	E	E	Q	E	E	E	E	E	E
H5	Q	V	Q	Q	V	V	V	V	V	V
H11	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V
H17	S	T	L	S	S	T	T	T	T	T
H20	L	I	L	L	I	I	I	I	I	I
H23	T	K	K	T	K	K	K	K	K	K
H28	N	T	N	N	N	N	T	T	T	T
H38	K	Q	R	K	R	R	R	R	R	R
H42	E	G	E	E	G	G	G	G	G	G
H43	Q	K	Q	Q	K	K	K	K	K	K
H54	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D
H56	N	E	D	D	D	D	D	E	E	E
H58	K	I	V	V	V	I	I	I	V	V
H66	K	R	K	K	R	R	R	R	R	R
H67	A	V	A	A	A	A	V	V	V	V
H75	S	T	S	S	T	T	T	T	T	T
H76	N	D	N	N	D	D	D	D	D	D
H80	L	M	L	L	L	M	M	M	M	M
H81	Q	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E
H83	T	R	T	T	T	R	R	R	R	R
H91	Y	Y	F	F	F	Y	Y	Y	F	Y
H93	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S
H94	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H108	T	L	T	T	L	L	L	L	L	L
H109	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V

Таблица 7

Нумерация Кэбота каркасных остатков (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 3D6

Остаток	ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82)	(Легкая цепь) IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	3D6 мыши (SEQ ID NO:11)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
L7	T	S	T	T	S	S
L10	T	S	T	T	S	S
L15	I	L	I	I	L	L
L17	Q	Q	Q	Q	Q	E
L24	K	R	K	K	K	R
L37	L	Q	L	L	L	Q
L45	K	R	K	K	K	R
L83	L	V	L	L	V	V
L86	H	Y	Y	H	Y	Y
L100	A	Q	G	A	A	Q
L106	L	I	I	L	I	I

Положения, в которых канонические, верньерные остатки или остатки поверхности взаимодействия отличаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами для замены. Примеры канонических/взаимодействующих с CDR остатков включают остатки согласно Кэботу H54 и H94 в табл. 3. Примеры остатков Вернье включают остатки согласно Кэботу H28, H67, H93 и H94 в табл. 3. Примеры остатков поверхности взаимодействия/остатков упаковки (VH+VL) включают остатки согласно Кэботу H91 и H93 в табл. 3.

Основания для выбора положений, указанных в табл. 3 в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими:

варибельные области тяжелой цепи hu3D6VHvb1 состоит из CDR-H1, H2 и H3 петель 3D6-VH, привитых на каркасную область 48G7-VH (RCS-VH), с обратными мутациями в положениях H91 (Y91F), H93 (A93S) и H94(S94T).

hu3D6VHvb2 отменены все замены в каркасной области в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов согласно Чотиа, являются частью зоны Вернье или локализируются на поверхности взаимодействия домена VH/VL, или способствуют структурной стабильности. 3D6-VH_vb2 включает обратные мутации или замены Q1E, Q5V, L11V, L20I, T23K, K38R, E42G, Q43K, K66R, S75T, N76D, Q81E, Y91F, A93S, S94T T108L и L109V для оценки вклада этих положений в антиген-связывающую аффинность и иммуногенность.

hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6 и hu3D6VHvb7 состоит из дополнительных замен и либо увеличивает стабильность антитела, и/или оптимизирует гликозилирование, агрегацию, N-концевую гетерогенность, термостабильность, участки с обнаженным зарядом на поверхности, участки с обнаженным зарядом на поверхности, дезаминирование и чувствительность к протеиназе.

Q1E: Q1E: представляет собой мутацию, повышающую стабильность для снижения потенциала образования пироглутамата (Liu, supra).

Q5V: представляет собой часто встречающуюся и мутацию выравнивания зародышевой линии. Val наиболее часто встречается в человеческих последовательностях в данном положении. Val находится в гене зародышевой линии человека IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в данном положении.

L11V: представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Val находится в гене зародышевой линии человека IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в данном положении.

S17T: представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Thr находится в гене зародышевой линии человека IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в данном положении.

L20I: представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Ile находится в гене зародышевой линии человека IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в данном положении.

T23K: представляет собой часто встречающуюся и мутацию выравнивания зародышевой линии. Lys наиболее часто встречается в данном положении. Lys находится в гене зародышевой линии человека IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в данном положении.

N28T: представляет собой замену в остатке CDR-H1 на Thr.

K38R: представляет собой часто встречающуюся обратную мутацию. Arg наиболее часто встречается в данном положении. По прогнозам, что Arg в данном положении создает две Н-связи с Glu 46 в дополнение к одной Н-связи, каждая с Asp86 и Tyr 90 в тяжелой цепи; следовательно, замещение Arg может повысить стабильность по сравнению с Lys в данном положении.

E42G: представляет собой часто встречающуюся и мутацию выравнивания зародышевой линии. Gly находится в гене зародышевой линии человека IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в данном положении. Gly наиболее часто встречается в данном положении. Замена Gly, по прогнозам, не влияет на стабильность.

Q43K: предполагается, что боковая цепь Lys в данном положении образует Н-связь с G42, помимо основной цепи, образующей Н-связи с Gln 39 и Arg 40, таким образом, замещение Lys может повышать стабильность по Q в данном положении.

N54D и D56E представляют собой замены остатков CDR, и предполагается, что они не будут контактировать с антигеном в соответствии с моделью гомологии. Предполагается, что замены N54D и D56E стабилизируют структуру антитела.

V58I: представляет собой замену остатка CDR-H2. Ген зародышевой линии IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) имеет He в данном положении. Предполагается, что остаток не контактирует с антигеном.

K66R: предполагается, что Arg в данном положении образует Н-связи с Ser 82a и Thr 83 помимо образования Н-связи и солевого мостика с Asp 86.

A67V: является заменой в остатке зоны Вернье. Ген зародышевой линии IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) имеет Val в данном положении.

S75T: предполагается, что Ser в данном положении образует Н-связь с Asp 72 и Tyr 76. Предполагается, что Thr в данном положении также образует эти связи, но присутствие остатка Thr на поверхности может повышать стабильность антитела.

N76D: Asp представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Asp находится в гене зародышевой линии человека IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в данном положении.

L80M: Met представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Met находится в гене зародышевой линии человека IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в данном положении.

Q81E: предполагается, что Glu образует Н-связь и солевой мостик с K19; поэтому Glu в данном положении усиливает стабильность антитела.

T83R увеличивает термостабильность и увеличивает степень гуманизации. Arg представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Arg находится в гене зародышевой линии человека IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в данном положении. Arg наиболее часто встречается в данном положении.

F91Y: представляет собой мутацию остатка поверхности взаимодействия и представляет собой часто встречающуюся обратную мутацию. Tyr обычно находится в данном положении и может увеличивать стабильность антитела.

A93S: представляет собой обратную мутацию зоны Вернье и остатка зоны поверхности взаимодействия.

S94T: представляет собой обратную мутацию канонического структурного остатка согласно Чотиа и остатка Вернье.

T108L: Leu представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Leu находится в гене зародышевой линии человека IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в данном положении. Предполагается, что Leu в данном положении делает антитело менее иммуногенным и не влияет на стабильность антитела.

L109V: представляет собой часто встречающуюся мутацию. Val наиболее часто встречается в данном положении.

Основания для выбора положений, указанных в табл. 4 в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими:

варибельные области легкой цепи каппа hu3D6VLvb1 состоит из CDR-L1, L2 и L3 петель 3D6-VL, привитого на каркасную область ARX71335 VL.

hu3D6VLvb2 и hu3D6VLvb3 отменены все замены в каркасной области в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов согласно Чотиа, являются частью зоны Вернье или локализируются на поверхности взаимодействия домена VH/VL. Hu3D6-VLvb2 & Hu3D6-VLvb3 также включают замены, которые способствуют структурной стабильности; hu3D6-VL_vb2 включает обратные мутации T7S, I15L, L83V, H86Y и L106I, для оценки вклада этих положений в антиген-связывающую аффинность и иммуногенность.

Hu3D6-VL_vb3 включает все замены, упомянутые для vb2 вместе с дополнительными изменениями в Q17E, K24R, L37Q, K45R и L106I.

T7S: представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Ser находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) в данном положении.

T10S: представляет собой часто встречающуюся и мутацию выравнивания зародышевой линии. Ser часто встречается в данном положении. Ser находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) в данном положении.

I15L: представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Leu находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) в данном положении.

Q17E: предполагается, что Glu в данном положении образует H-связь с T14 и солевой мостик с Lys 107, двумя остатками легкой цепи, и увеличивает стабильность антитела.

K24R: представляет собой мутацию остатка CDR. Как Lys, так и Arg, предполагается, образуют H-связь и солевой мостик с Asp 70 в легкой цепи. Предполагается, что Arg больше подходит для данной конформации. Arg также представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Arg находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) в данном положении.

L37Q: предполагается, что он представляет собой глубоко расположенный остаток, предполагается, что Leu не будет взаимодействовать с окружающими остатками, тогда как предполагается, что Gln образует H-связи с Q38 и Asp 82 в легкой цепи. Gln также является мутацией выравнивания зародышевой линии. Gln находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) в данном положении.

K45R: хотя предполагается, что Lys образует водородные связи с S56 и Gly 57; предполагаемое взаимодействие Arg с соседними остатками намного более обширно, поскольку предполагается, что он образует солевые мостики с D55, H-связь с Arg46 и двойные H-связи с S56. Arg также является мутацией выравнивания зародышевой линии. Arg находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) в данном положении.

L83V: Она представляет собой часто встречающуюся мутацию остатка, который, по прогнозам, будет находиться на поверхности. Val также является мутацией выравнивания зародышевой линии. Val находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) в данном положении.

H86Y: 3D6 VL мыши имеет Tug в данном положении. Tug также представляет собой наиболее часто встречающийся остаток в данном положении.

A100Q: Ala редко встречается в данном положении. Предполагается, что Ala представляет собой остатки на поверхности и не взаимодействует с окружающими остатками. Gln наиболее часто встречается в данном положении, и также является мутацией выравнивания зародышевой линии. Gln находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) в данном положении. Предполагается, что Gln образует H-связь с Ser 7, стабилизируя цепь изнутри.

L106I: представляет собой часто встречающуюся и мутацию выравнивания зародышевой линии. Ile наиболее часто встречается в данном положении. Ile находится в гене зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) в данном положении.

Дизайны на основе данных каркасных областей человека являлись следующими:
вариабельные области тяжелой цепи

>hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFKGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGGQTTLTVSS

>hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)

EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPGKGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFKGRATITADTSTDYALELSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGGQTLTVSS

>hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPGKGLEWIGWIDPE
NGDTIYDPKFKGRATITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGGQTLTVSS

hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPGKGLEWIGWIDPE
NGDTIYDPKFKGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGGQTLTVSS

>hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGLEWIGWIDPE
DGETIYDPKFQGRVTITADTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGGTLVTVSS

>hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGLEWIGWIDPE
DGETVYDPKFQGRVTITADTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYFCSTLDFWGGTLVTVSS

>hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGLEWIGWIDPE
DGETVYDPKFQGRVTITADTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGGTLVTVSS

вариабельные области легкой цепи каппа

hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)

DVVMVTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCWQGTTHFPYTFGAGTKLELK

>hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)

DVVMVTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGAGTKLEIK

>hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)

DVVMVTQSPLSLSVTLGEPASISCRSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQSPRRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGAGTKLEIK

Гуманизированные последовательности были получены с применением двухэтапного протокола ПЦР, который позволяет вводить несколько мутаций, делеций и вставок с применением сайт-направленного мутагенеза QuikChange [Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) *BioTechniques* 26:680-682].

Пример 4. Моноклональные антитела мыши связываются с тау в анализах ELISA.

Способы: непрямой ELISA: 96-луночные полистирольные планшеты сенсибилизовали захватывающими антителами против 6×His (фиг. 4A) или поликлональными антителами против тау (Dako №A0024, фиг. 4B), суспендированными в 1× ФБР, в течение 2 ч при к.т. (комнатной температуре) или 16 ч при температуре 4°C. Нанесенный материал удаляли, и планшеты блокировали в течение 1 ч 1% БСА в 1× ФБР с последующей инкубацией с рекомбинантным тау человека с полигистидиновой меткой на N-конце белка (фиг. 5A) или без нее (фиг. 4B). После промывки планшеты инкубировали с указанными антителами, промывали и инкубировали с конъюгированным с ПХ (пероксидазой хрена) вторичным антителом козы против иммуноглобулинов мыши. Реакцию в планшетах запускали добавлением ТМБ, и A₄₅₀ измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов.

Сэндвич-ELISA: 96-луночные полистирольные планшеты сенсибилизовали антителами против иммуноглобулинов мыши в 1× ФБР в течение 2 ч при к.т. или 16 ч при температуре 4°C. Нанесенный материал удаляли, и планшеты блокировали в течение 1 ч 1% БСА в 1× ФБР. Затем планшет инкубировали с указанными антителами в идентичных концентрациях, разведенными в 0,1% БСА в 1× ФБР. Планшеты последовательно обрабатывали тау человека, поликлональными антителами кролика против тау (Dako №A0024) и конъюгированным с ПХ антителом козы против иммуноглобулинов кролика, все из которых были разведены в 0,1% БСА в ФБР, с промывками между каждым этапом. Добавляли стрептавидин-ПХ, реакцию в планшетах запускали добавлением ТМБ, и A₄₅₀ измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов. См. фиг. 4C.

Результаты: панель продуцированных гибридомой антител анализировали в отношении связывания с тау с помощью нескольких различных форматов ELISA. Обнаружение тау подтверждали с применением непрямого формата, с применением тау-белка, иммобилизованного посредством его слитой с N-концом полигистидиновой метки (фиг. 4A). Также подтверждали связывание с нативным немеченым белком (фиг. 4B). Для оценки аффинности различных антител в растворе использовали формат сэндвич-ELISA, в котором исследуемые антитела гибридомы применяли в качестве захватывающих реактивов (фиг. 4C).

Пример 5. Аффинность моноклональных антител мыши в отношении тау.

Способы: анализ методом НИР (поверхностного плазмонного резонанса) проводили с применением прибора Biacore T200 для определения кинетики связывания антител мыши с рекомбинантным тау человека. Для подготовки поверхности сенсора антитело против иммуноглобулинов мыши (GE Life Sciences) иммобилизовали на сенсорный датчик CM5 посредством аминного сочетания, и антитело захватывали на уровне, который обеспечивал максимальное связывание 50 Е.О. (единиц ответа). Над захваченным лигандом пропускали различные концентрации рекомбинантного тау, варьирующие от 10 - 0,14 нМ, при скорости потока 50 мкл/мин. в буфере для анализа (HBS + 0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в течение 180 с ассоциации и 900 с диссоциации. Данные соотносили дважды как к нерелевантному сенсору, не содержащему лиганд антитела, так и к концентрации аналита 0 нМ для учета диссоциации лиганда от захватывающих

вающей молекулы. Затем данные анализировали с применением глобальной подгонки 1:1.

Результаты: несколько антител мыши были выбраны в группе анализов ELISA на основании их характеристик, и их аффинности связывания оценивали методом ППР. Антитела исследовали в параллельных группах, и их скорости ассоциации и диссоциации связывания сравнивали с выбранным антителом с наивысшими связывающими свойствами с рекомбинантным тау человека. Наивысшую аффинность связывания наблюдали для клона антитела 3D6. Аффинности связывания представлены на фиг. 5.

Пример 6. Моноклональные антитела мыши предотвращают связывание тау человека с поверхностью иммортализованных нейронных клеток.

Способы: ингибирование связывания тау с клетками нейробластомы В103 с помощью моноклональных антител против тау

1. Клетки В103 ресуспендировали в ФБР в концентрации 5×10^5 клеток/мл. В планшет MSD High Bind высевали по 50 мкл суспензии клеток на лунку. Получали концентрацию 25К клеток/лунку. Планшет накрывали, и позволяли клеткам присоединиться при температуре 37°C, 5% CO₂, в течение 2 ч.

2. После присоединения клеток из лунок удаляли ФБР посредством переворачивания планшета и аккуратного постукивания для удаления избытка буфера. В каждую лунку добавляли 50 мкл 3% Блокатора А MSD в ФБР или другого подходящего блокирующего буфера и инкубировали планшет при к.т. в течение 1 ч без встряхивания.

3. В течение этапа блокирования планшета совместно инкубировали тау и антитела против тау следующим образом:

a. Начинали с антитела против тау в концентрации 2 мг/мл и готовили серийные разведения в ФБР, в соотношении 1:2, для 7 дополнительных разведений.

b. Разводили тау в ФБР до концентрации 20 нМ. Концентрация тау в каждой лунке являлась постоянной.

c. Перемешивали тау и антитело против тау в соотношении 1:1 до конечной концентрации тау 10 нМ и начальной концентрации антитела против тау 1 мг/мл.

d. Инкубировали смесь в течение приблизительно 1 ч при к.т. при встряхивании (600 об/мин).

4. После блокирования планшета, этап 2, из лунок удаляли блокирующий буфер посредством переворачивания планшета и аккуратного постукивания и дважды промывали планшет ФБР с применением многоканальной пипетки. Убеждались, что избыток буфера был полностью удален. Перед добавлением комплексов тау: антитело против тау охлаждали высевные клетки до температуры 4°C.

5. К высевным клеткам добавляли 50 мкл охлажденного комплекса, этап 3, и инкубировали на льду в течение 30 мин.

6. Дважды промывали планшет охлажденным ФБР, как описано ранее.

7. Добавляли 50 мкл 16B5.SULFO-TAG на лунку для обнаружения связанного с поверхностью клеток тау. Инкубировали на льду в течение 30 мин.

8. Снова дважды промывали планшет охлажденным ФБР, как описано ранее.

9. Добавляли 150 мкл на лунку 1× буфера для считывания Т без поверхностно-активного вещества (разведенного в H₂O) и незамедлительно проводили считывание на приборе MSD SECTOR™ 600. Избегали образования пузырьков при добавлении буфера для считывания.

10. Фиксировали сигналы MSD в зависимости от концентрации антитела против тау.

Исследуемые антитела представляли собой антитела против тау 3D6, 16G7, 3H9, 4C5 и 5G8 и изотипический контроль.

Результаты:

Снижение сигнала SulfoTag против тау, наблюдавшееся при увеличении концентрации исследуемого антитела, свидетельствует о функциональном блокировании связывания тау с поверхностями нейронных клеток. В случае изотипического контроля, 16G7 или 3H9 блокирования не наблюдалось. Увеличивающиеся количества функциональной блокирующей активности наблюдали в случае 4C5, 5G8 и 3D6. 3D6 продемонстрировало наиболее глубокую блокирующую активность среди исследованных антител. См. фиг. 6.

Пример 7. Активность дезагрегации.

Способы: агрегация рекомбинантного тау. Очищенный рекомбинантный тау с N-концевой меткой 6xHis сочетали с эквимольными количествами низкомолекулярного гепарина в 1× ФБР (pH 7,4) и инкубировали при температуре 37°C в течение 96 ч на шейкере-качалке. Агрегацию образца подтверждали посредством связывания с тιοфлавином Т.

Инкубация с антителами. Антитела инкубировали с агрегированным рекомбинантным тау в указанных молярных соотношениях, инкубировали при температуре 37°C в течение 96 ч без вращения или покачивания. По окончании эксперимента измеряли агрегацию посредством инкубации образцов с 25 мМ тιοфлавином Т и измерения испускаемой флуоресценции (возбуждение/испускание 450/482). Из сигналов вычитали фон образцов буфера.

Результаты: как показано на фиг. 7, 3D6, предпочтительно, деассемблирует интактные волокна тау. Варьирующие молярные соотношения 3D6 (треугольники), изотипический контроль (круги) и 16G7

(квадраты) инкубировали с амилоид-содержащими волокнами тау в течение 96 часов. По окончании данного периода времени оценивали степень агрегации посредством связывания с тиофлавином Т. 3D6, предпочтительно, снижает сигнал тиофлавина Т, присутствующий в образце, по сравнению как с антителом изотипического контроля, так и с 16G7, антителом против тау, которое связывается с отличной областью тау.

Пример 8. 3D6 и 5G8 иммунным способом захватывают тау из пораженной заболеванием ткани человека.

Способы: растворенные в высококонцентрированном солевом растворе фракции белка готовили в концентрации 1 мг/мл. Для каждой иммунопреципитации использовали 200 мкг образца. 10 мкг указанного антитела (изотипический контроль, 3D6 или антитело против тау 5G8) добавляли к препаратам образца в высококонцентрированном солевом растворе и инкубировали в течение 2 ч. Затем к смесям добавляли магнитные бусины с белком G и инкубировали еще в течение часа для захвата комплексов антитело/антиген. Образцы тщательно промывали 1× ФБР, и бусины кипятили в восстанавливающем/денатурирующем буфере для образца для высвобождения захваченных белков. Полученные в результате образцы разделяли методом ПААГ-ДСН (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и проводили вестернблоттинг с применением поликлонального антитела против тау (Dako, №A0024).

Результаты: как показано на фиг. 8, 3D6 и 5G8 иммунопреципитировали тау из ткани, пораженной заболеванием Альцгеймера. Растворенные в высококонцентрированном солевом растворе фракции образцовывали иммунопреципитат с указанным антителом, и их обнаруживали с помощью поликлонального антитела против тау, направленного против отдельной области молекулы тау из связывающих сайтов для 3D6 и антитела А против тау. 3D6 надежно захватывал тау из данной фракции. Образцы на входе (растворенный в высококонцентрированном солевом растворе образец) представлены справа.

Пример 9. Иммуногистохимическое исследование иммунореактивности 3D6.

Кору головного мозга лобно-височной области получали от пациентов, не страдающих от нейродегенеративного заболевания, или страдающих от болезни Альцгеймера, что подтверждали в ходе пострепаративной оценки. Иммуногистохимическое исследование проводили на слегка фиксированных ацетоном криосрезах толщиной 10 мкм, закрепленных на стекле. Все этапы окрашивания проводили с помощью автоматического устройства для окрашивания Leica BOND Rx с применением расходных материалов Leica. Форму 3D6 мыши или человека инкубировали со срезами ткани с последующим добавлением соответствующих виду вторичных антител, конъюгированных с полимером ПХ. Для предотвращения неспецифического связывания эндогенных иммуноглобулинов при применении гуманизированных антител на ткани человека антитела перед инкубацией с тканью нековалентно метили конъюгированным с биотином моновалентным Fab-фрагментом против иммуноглобулинов человека *in vitro*. Ткань, меченную комплексом первичное антитело - Fab-фрагмент с биотином, затем амплифицировали с применением системы амплификации авидин-биотин (Vector Laboratories, Бурлингем, Калифорния). Окрашивание визуализировали с помощью хромогена DAB, который вызывал образование осадка коричневого цвета. Отрицательный контроль заключался в осуществлении всей иммуногистохимической процедуры на прилежащих срезах с антителом IgG изотипического контроля.

Исследуемые антитела представляли собой CD6 мыши, химерное 3D6 (которое содержало VH и VL из антитела мыши с константными областями человека, тяжелую цепь SEQ ID NO: 72 и легкую цепь SEQ ID NO: 73) и гуманизированный вариант hu3D6VHv5/hu3D6VLv2.

Окрашивание, которое проводили с антителом мыши, химерной и гуманизированной формами 3D6, качественно сравнивали и оценивали в отношении устойчивости и интенсивности окрашивания, а также локализации иммунореактивности. Интенсивность окрашивания была аналогичной для химерной и гуманизированной форм 3D6 и демонстрировала аналогичный характер локализации по сравнению с формой антитела мыши. Тау был обнаружен в нейрофибриллярных клубках, волокнах, нитях нейропилей и в дегенерирующих аксонах. Также наблюдалось заметное соматическое окрашивание.

Пример 10. Аффинность гуманизированных вариантов в отношении тау.

Способы. Непрямой ELISA. 96-луночные полистирольные планшеты сенсibilizировали рекомбинантным тау человека, суспендированным в 1× ФБР, в течение 2 ч при к.т. или 16 ч при температуре 4°C. Нанесенный материал удаляли, и планшеты блокировали в течение 1 ч 1% БСА в 1× ФБР. В планшеты добавляли гуманизированный вариант антител в концентрации 1 мкг/мл в 0,1% БСА в 1× ФБР в течение 1 ч с последующей промывкой, и добавляли конъюгированное с ПХ антитело козы против иммуноглобулинов человека. Реакцию в планшетах запускали добавлением ТМВ, и A_{450} измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов.

Сэндвич-ELISA 96-луночные полистирольные планшеты сенсibilizировали антителами против иммуноглобулинов человека в 1× ФБР в течение 2 ч при к.т. или 16 ч при температуре 4°C. Нанесенный материал удаляли, и планшеты блокировали в течение 1 ч 1% БСА в 1× ФБР. В планшеты добавляли гуманизированный вариант антител в варьирующих концентрациях, как указано, разведенные в 0,1% БСА в 1× ФБР, в течение 1 ч с последующей промывкой, и добавляли биотинилированный рекомбинантный

тау человека, разведенный в 0,1% БСА в 1× ФБР. После промывки добавляли стрептавидин-ПХ, реакцию в планшетах запускали добавлением ТМВ, и A_{450} измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов.

Анализ методом ППП проводили с применением прибора Biacore T200 для определения кинетики связывания h3D6-VHv5-L2 с рекомбинантным тау человека. Для подготовки поверхности сенсора на сенсорный датчик CM5 иммобилизовали антитело против иммуноглобулинов человека (GE Life Sciences) посредством аминного сочетания, и гуманизированный вариант антитела захватывали на уровне, который обеспечивает максимальное связывание 50 Е.О. Над захваченным лигандом пропускали различные концентрации рекомбинантного тау, варьирующиеся от 10-0,14 нМ, при скорости потока 50 мкл/мин в буфере для анализа (HBS + 0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в течение 180 с для ассоциации и 900 с для диссоциации. Данные соотносили дважды как к нерелевантному сенсору, не содержащему лиганд антитела, так и к концентрации анализита 0 нМ для учета диссоциации лиганда от захватывающей молекулы. Затем данные анализировали с применением глобальной подгонки 1:1.

Пример 11. Иммуногенность варибельной области легкой цепи hu3D6VLv2.

Аминокислотные последовательности варибельной области легкой цепи hu3D6VLv2 (SEQ ID NO: 21) анализировали с применением iedb.org Deimmunization Tool (Dhanda et al., Immunology. 2018 Jan;153(1):118-132). В табл. 8 показаны пептиды, которые могут быть выбраны для деиммунизации hu3D6VLv2, т.е. указаны области, в которых могут быть сделаны дополнительные замены для снижения потенциальной иммуногенности.

Таблица 8

Результаты анализа иммуногенности для выявления потенциальных пептидов для деиммунизации

Начальное положение (линейный)	Конечное положение (Линейный)	Медианный процентиль	Пептид
1	15	14,845	DVVMTQSPVSLPVTL
51	65	15,745	RLIYLVSKLDSGVPD
46	60	18,58	GQSPRRLIYLVSKLD

На основе результатов анализа, показанных в табл. 8, были сконструированы варианты варибельной области легкой цепи hu3D6VLv2, причем мишенью являлись остатки аминокислот, выделенные жирным шрифтом в табл. 9. Каждый вариант включает одну из следующих замен аминокислот, как показано в табл. 10.

Таблица 9

Остатки аминокислот в hu3D6VLv2, являющиеся мишенью для замены.

Остатки-мишени варибельной области легкой цепи hu3D6VLv2	Оригинальная SEQ ID NO
DVVMTQSPVSLPVTL GG PASISCKSSQ SL L	21
DSDGKTYLNWLLQ R PGQSPRRLIYLVSKLD	
SGVPDRFSGSGGTDF T LKISRVEAEDVGV	
YYCWQGT H FPYTFGGGTKLEIK	

Таблица 10

Замены аминокислот в hu3D6VLv2, сконструированные для снижения иммуногенности

Линейный номер	Номер по Кэботу	Название варианта	SEQ ID NO полученной вариательной области легкой цепи
L59D	L54D	hu3D6VLv2 L54D (также известный как L2-DIM21)	SEQ ID NO:93
L59G	L54G	hu3D6VLv2 L54G (также известный как L2-DIM7)	SEQ ID NO:94
L59N	L54N	hu3D6VLv2 L54N	SEQ ID NO:95
L59E	L54E	hu3D6VLv2 L54E	SEQ ID NO:96
L55E	L50E	hu3D6VLv2 L50E	SEQ ID NO:97
L59Q	L54Q	hu3D6VLv2 L54Q	SEQ ID NO:98
L55D	L50D	hu3D6VLv2 L50D	SEQ ID NO:99
L59K	L54K	hu3D6VLv2 L54K	SEQ ID NO:100
L59R	L54R	hu3D6VLv2 L54R	SEQ ID NO:101
L59T	L54T	hu3D6VLv2 L54T	SEQ ID NO:102
L55G	L50G	hu3D6VLv2 L50G (также известный как L2-DIM22)	SEQ ID NO:103
I53G	I48G	hu3D6VLv2 I48G	SEQ ID NO:104
I53D	I48D	hu3D6VLv2 I48D	SEQ ID NO:105
L52G	L47G	hu3D6VLv2 L47G	SEQ ID NO:106
Y54E	Y49E	hu3D6VLv2 Y49E	SEQ ID NO:107
L59V	L54V	hu3D6VLv2 L54V	SEQ ID NO:108
L59S	L54S	hu3D6VLv2 L54S	SEQ ID NO:109
S57G	S52G	hu3D6VLv2 S52G (также известный как L2-DIM9)	SEQ ID NO:110
L52N	L47N	hu3D6VLv2 L47N	SEQ ID NO:111
L52D	L47D	hu3D6VLv2 L47D	SEQ ID NO:112
L52E	L47E	hu3D6VLv2 L47E	SEQ ID NO:113
L52P	L47P	hu3D6VLv2 L47P	SEQ ID NO:114
L52T	L47T	hu3D6VLv2 L47T	SEQ ID NO:115
L52S	L47S	hu3D6VLv2 L47S	SEQ ID NO:116
L52A	L47A	hu3D6VLv2 L47A	SEQ ID NO:117
L55V	L50V	hu3D6VLv2 L50V	SEQ ID NO:118

Были сконструированы дополнительные варианты вариательной области легкой цепи hu3D6VLv2, как показано в табл. 11, которые включают замены у одного или двух остатков аминокислот, выделенных в табл. 9. Некоторые варианты в табл. 11 также включают замену L37Q (SEQ ID NO: 119 -135 и 145) или как замену L37Q, так и замену G100Q (SEQ ID NO: 136-142).

Обоснование выбора положений L37Q и G100Q как, указано в табл. 11 и табл. 12, в вариательной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

L37Q представляет собой мутацию, повышающую гуманизацию последовательности. Gln представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Gln находится в гене человеческой зародышевой линии IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) в данном положении.

G100Q представляет собой мутацию, повышающую гуманизацию последовательности. Gln представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Gln находится в гене человеческой зародышевой линии IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) в данном положении.

Таблица 11

Замены аминокислот в hu3D6VLv2, сконструированные для снижения иммуногенности

Замены в дополнительных вариантах в hu3D6VLv2, сконструированные для снижения иммуногенности (указан номер мутации(й) по Кэботу)	Название варианта	SEQ ID NO: полученной варибельной области легкой цепи
L37Q_L50G_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (также известный как L2-DIM1)	SEQ ID NO:119
L37Q_L50G_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (также известный как L2-DIM2)	SEQ ID NO:120
L37Q_S52G_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (также известный как L2-DIM3)	SEQ ID NO:121
L37Q_S52G_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (также известный как L2-DIM4)	SEQ ID NO:122
L37Q_S52G_L54T	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (также известный как L2-DIM5)	SEQ ID NO:123
L37Q_S52G_L54D	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (также известный как L2-DIM6)	SEQ ID NO:124
L37Q_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L54R	SEQ ID NO:125
L37Q_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L54G	SEQ ID NO:126
L37Q_L54D	hu3D6VLv2 L37Q_L54D (также известный как L2-DIM12)	SEQ ID NO:127
L37Q_L50G	hu3D6VLv2 L37Q_L50G (также известный как L2-DIM13)	SEQ ID NO:128
L37Q_L50D	hu3D6VLv2 L37Q_L50D (также известный как L2-DIM14)	SEQ ID NO:129
L37Q_L54T	hu3D6VLv2 L37Q_L54T	SEQ ID NO:130
L37Q_S52G	hu3D6VLv2 L37Q_S52G	SEQ ID NO:131
L37Q_L54E	hu3D6VLv2 L37Q_L54E	SEQ ID NO:145
L37Q_L50D_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (также известный как L2-DIM17)	SEQ ID NO:132
L37Q_L50D_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (также известный как L2-DIM18)	SEQ ID NO:133

L37Q_L50E_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (также известный как L2-DIM19)	SEQ ID NO:134
L37Q_L50E_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (также известный как L2-DIM20)	SEQ ID NO:135
L37Q_L50G_L54R_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q	SEQ ID NO:136
L37Q_L50G_L54G_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q	SEQ ID NO:137
L37Q_S52G_L54R_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q	SEQ ID NO:138
L37Q_S52G_L54D_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q	SEQ ID NO:139
L37Q_L50D_L54G_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q	SEQ ID NO:140
L37Q_L50D_L54R_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q	SEQ ID NO:141
L37Q_L50V_L54D_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q	SEQ ID NO:142

Дополнительные варианты варибельной области легкой цепи hu3D6VLv2 были сконструированы для включения L37Q (SEQ ID NO: 143) или для включения G100Q (SEQ ID NO: 144), как показано в табл. 12.

Таблица 12
Дополнительные замены аминокислот в hu3D6VLv2

Замены в дополнительных вариантах в hu3D6VLv2 (указан номер мутации(й) по Кэботу)	Название варианта	SEQ ID NO: полученной варибельной области легкой цепи
L37Q	hu3D6VLv2 L37Q (также известный как L2-DIM8)	SEQ ID NO:143
G100Q	hu3D6VLv2 G100Q	SEQ ID NO:144

На фиг. 10A, 10B, 10C и 10D показаны выравнивания варибельной области легкой цепи гуманизованных версий антитела 3D6:

hu3D6VLv2 (SEQ ID NO:21), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103), hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101), hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128), hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131), hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125), hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127), hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137), hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139) и hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138).

Пример 12. Иммуногенность hu3D6VHv1bA11 (вариабельная область тяжелой цепи).

Были сконструированы дополнительные варианты вариабельной области тяжелой цепи hu3D6VHv1bA11 (также известного как h3D6Hu5) (SEQ ID NO: 18), как показано в табл. 13.

На фиг. 9А и 9В показаны выравнивания вариабельной области тяжелой цепи мышиноного 3D6 (SEQ ID NO: 7) и гуманизированных версий антитела 3D6 (hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6, hu3D6VHvb7, hu3D6VHv1bA11, h3D6VHvb8 и h3D6VHvb9) с последовательностью вариабельной области тяжелой цепи зародышевой линии человека IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) и последовательности вариабельной области тяжелой цепи акцептора человека 2RCS VH hFrwk (SEQ ID NO: 75). hu3D6VHvb1 представляет собой SEQ ID NO: 76, hu3D6VHvb2 представляет собой SEQ ID NO: 77, hu3D6VHvb3 представляет собой SEQ ID NO: 78, hu3D6VHvb4 представляет собой SEQ ID NO: 79, hu3D6VHvb5 представляет собой SEQ ID NO: 80, hu3D6VHvb6 представляет собой SEQ ID NO: 90, hu3D6VHvb7 представляет собой SEQ ID NO: 91, hu3D6VHv1bA11 представляет собой SEQ ID NO: 18, h3D6VHvb8 представляет собой SEQ ID NO: 146 и h3D6VHvb9 представляет собой SEQ ID NO: 148.

Таблица 13

Дополнительные замены аминокислот в hu3D6VHv1bA11 (также известном как h3D6Hu5)

Замены в дополнительных вариантах в hu3D6VHv1bA11 (указан номер мутации(й) по Кэботу)	Название варианта	SEQ ID NO полученной вариабельной области тяжелой цепи
D60E	hu3D6VHv1bA11 D60E (также известный как h3D6VHvb8)	SEQ ID NO:146
L82cV	hu3D6VHv1bA11 L82cV	SEQ ID NO:147
D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R	hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (также известный как h3D6VHvb9)	SEQ ID NO:148

Обоснования выбора положений, как указано в табл. 13, в вариабельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

D60E: для снижения потенциального протеолиза. Известно, что мотивы Asp-Pro являются потенциальными сайтами протеолитического расщепления. В hu3D6VHv1bA11 (h3D6Hu5) VH имеется мотив Asp-Pro в положении 60-61 по Кэботу. На основе модели гомологии замена Glu в положении 60 считается сохраняющей конформацию. Следовательно, замена D60E производится для снижения потенциального протеолиза.

Q81E, для повышения термостабильности и гуманизации. Предполагается, что Glu образует H-связь и солевой мостик с K19, следовательно, Glu в этом положении повышает стабильность антитела. Glu представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Glu находится в гене зародышевой линии человека IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в этом положении.

L82cV для снижения иммуногенности. Анализ *in silico* иммуногенности гуманизированного hu3D6VHv1bA11 (h3D6Hu5) с использованием инструмента анализа иммуногенности IEDB (база данных иммунных эпитопов) предсказал потенциальный иммуногенный пептид, который включал L82c. Замена L82cV предназначена для снижения иммуногенности. Замена на валин в этом положении сохраняет конформацию петли.

L80M для снижения иммуногенности; и повышения гуманизации. Met представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Met находится в гене зародышевой линии человека IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в этом положении.

T83R для повышения термостабильности и повышения гуманизации. Arg представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Arg находится в гене зародышевой линии человека IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в этом положении. Arg наиболее часто встречается в этом положении.

Пример 13. Анализ вариантов гуманизированного 3D6.

Гуманизированные варианты 3D6 с предсказанными деиммунизирующими заменами анализировали по нескольким характеристикам, включая аффинность связывания с мишенью, активность в клеточных анализах, термостабильность, характеристики экспрессии и количество замен. Во всех случаях результаты сравнивали с исходной последовательностью hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2, чтобы определить, отмечена ли потеря активности или стабильности.

Анализ связывания мишени выполняли с использованием Biacore T200 для сравнения аффинности связывания гуманизированных вариантов 3D6 с рекомбинантным тау-белком 4R0N человека. Антитело

против Fc человека иммобилизовали на сенсорном датчике CM3 посредством аминного сочетания, и гуманизированные варианты 3D6 были захвачены до эквивалентных уровней. Различные концентрации рекомбинантного тау-белка 4R0N человека (в диапазоне от 0,02 нМ до 12,5 нМ) пропускали через захваченный лиганд со скоростью 50 мкл/мин в рабочем буфере (HBS + 0,05% P-20, 1 мг/мл BSA) в течение 180 с ассоциации/420 с диссоциации в одном цикле. Из данных вычитали как данные нерелевантного сенсора, не содержащего антитела, так и концентрации анализа 0 нМ. Анализ проводили с применением глобальной подгонки 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore Evaluation.

Определение аффинности выявило ряд деиммунизированных вариантов, которые сохранили аффинность исходного hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2, которую определяли путем сравнения K_D каждого антитела с K_D исходного hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2. Антитела, для которых определено, что K_D сравнима с 4-кратным hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2 (табл. 14), включают

hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4,
 hu3D6VHv1bA11/L2-DIM9, hu3D6VHv1bA11/L2-DIM5, hu3D6VHv1bA11/L2-DIM3,
 h3D6VHvb8/L2-DIM4, hu3D6VHv1bA11/L2-DIM7, h3D6VHvb8/L2-DIM7, h3D6VHvb8/L2-
 DIM8, hu3D6VHv1bA11/L2-DIM12, hu3D6VHv1bA11/L2-DIM21 и hu3D6VHv1bA11/L2-
 DIM22. hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4

демонстрирует улучшенную аффинность, о чем свидетельствуют значения скорости ассоциации, скорости диссоциации и K_d по сравнению с исходным hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2.

Таблица 14

Аффинность гуманизированных вариантов 3D6

Гуманизированный вариант 3D6	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	4.17E+06	7.40E-04	1.81E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	5.65E+06	5.35E-04	9.48E-11
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM9	4.63E+06	7.40E-04	1.60E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM5	4.02E+06	7.35E-04	1.83E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM3	3.93E+06	7.81E-04	1.99E-10
h3D6VHvb8/L2-DIM4	4.51E+06	1.02E-03	2.26E-10
h3D6VHvb8/L2-DIM7	4.31E+06	1.19E-03	2.75E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM7	3.46E+06	9.71E-04	2.81E-10
h3D6VHvb8/L2-DIM8	3.28E+06	1.40E-03	4.27E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM12	2.74E+06	1.33E-03	4.85E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM21	2.15E+06	1.49E-03	6.96E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM22	3.54E+06	2.51E-03	7.08E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM1	3.02E+06	2.60E-03	8.59E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM13	3.15E+06	2.85E-03	9.04E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM-17	5.24E+10	5.42E+01	1.03E-09
h3D6VHvb8/L2-DIM1	6.19E+06	6.41E-03	1.04E-09
h3D6VHvb8/L2-DIM2	1.03E+10	1.46E+01	1.42E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM6	3.08E+06	4.61E-03	1.49E-09
h3D6VHvb8/L2-DIM6	3.79E+09	5.67E+00	1.50E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM14	7.69E+10	1.18E+02	1.53E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM2	5.73E+06	9.33E-03	1.63E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM19	3.28E+09	5.88E+00	1.79E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM-18	1.51E+06	3.78E-03	2.51E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM20	2.60E+05	9.35E-03	3.60E-08

Кроме того, в качестве вторичных характеристик для всех деиммунизированных вариантов анализировали термостабильность и титр. Уровни термостабильности и титра сравнивали для антител, которые были сопоставимы с hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2, на основе измерений аффинности, и антитела в табл. 15 перечислены в порядке, основанном на отклонении от T_m of hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2.

Значения термостабильности определяли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Все сканирование DSC выполняли с использованием системы VP-Capillary DSC (Malvern).

Все образцы были приготовлены с концентрацией 0,5 мг/мл в 1×ФБР и относительно 1×ФБР. Приблизительно 0,5 мл раствора белка и буфера вводили в образец и контрольную ячейку. Калориметрическое сканирование выполняли при скорости сканирования 60°C/ч, от 25°C до 110°C при постоянном давлении. Анализ проводили с использованием специфического программного обеспечения. Сообщаемые значения представляют собой температуру, при которой регистрируется максимальная теплоемкость пика Fab.

Титр определяли следующим образом. После экспрессии в суспензии клеток 293, антитела очищали с применением хроматографии на основе белка А, с применением стандартных способов. После очистки антитела заменяли на 1×ФБР, и концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм. Титры рассчитывали путем деления конечного выхода очищенного белка на начальный объем экспрессирующей культуры, и выражали в миллиграммах на литр. hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 демонстрирует более высокую термостабильность и титр относительно исходного hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2. Термостабильность и временные уровни экспрессии (титр) являются важными факторами при разработке лекарственных средств.

Таблица 15
Термостабильность и титр гуманизированных вариантов 3D6

Гуманизированный вариант 3D6	T _m (°C)— отклонение от hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	титр (мг/л)
hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	0,00	456,00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	0,08	467,00
h3D6VHvb8/L2-DIM8	-0,38	301,00
h3D6VHvb8/L2-DIM4	-0,78	445,00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM22	-1,23	570,00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM9	-2,19	290,00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM5	-3,34	383,00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM7	-4,24	231,00
h3D6VHvb8/L2-DIM7	-4,83	271,00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM3	-5,01	283,00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM21	-5,17	81,00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM12	-5,47	94,00

На основании анализа приведенных выше результатов, нейтрализующая активность семи антител в табл. 15 была выбрана для дальнейшего анализа в клеточной модели интернализации тау: отмечены замены в тяжелой и легкой цепях относительно исходного hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2.

Для оценки способности различных антител блокировать интернализацию тау в нейронах был проведен анализ интернализации с использованием сортировки активированных флуоресценцией клеток (FACS). Антитела, которые блокируют интернализацию, вероятно, блокируют передачу тау.

Агрегаты растворимого тау получали инкубацией рекомбинантного полноразмерного тау с эквивалентными количествами низкомолекулярного гепарина в течение 3 дней при 37 °C. После инкубации нерастворимый и растворимый тау отделяли центрифугированием при 10 000 g в течение 15 мин. Затем супернатант разделяли препаративной эксклюзионной хроматографией, собирали и концентрировали агрегированные пики (более 100 кДа). Для измерения интернализации фракцию растворимого агрегата метили сукцинимидоловым сложным эфиром pHrodo Red, который флуоресцирует при интернализации в эндолизосомный путь.

Меченый посредством pHrodo растворимый олигомер 4R0N тау P301L человека (конечная концентрация 1,5 мкг/мл) предварительно инкубировали с антителами против тау (титрование дозы: начальная концентрация 80 мкг/мл с последующими 4-кратными серийными разведениями) в течение 30 мин при комнатной температуре в среде для культивирования клеток. Затем смесь тау/антитела добавляли к клеточным линиям нейробластомы B103 при конечной концентрации 500 000 клеток/мл и инкубировали в течение 3-4 ч при 37°C в инкубаторе для культур тканей (5% CO₂). Затем клетки промывали 3 раза культуральной средой, затем инкубировали 10 мин в культуральной среде и промывали 2 раза буфером FACS (1% FBS в PBS). Клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и средней интенсивности флуоресценции Texas Red, измеренной с помощью FACS LSR II. Флуоресценция Texas red из pHrodo активируется низким pH, связанным с эндолизосомными компартментами при интернализации. Поскольку FACS обнаруживает клетки, и pHrodo флуоресцирует только при интернализации, обнаруживается только ин-

тернализированный клетками тау. Чем ниже средняя интенсивность флуоресценции, тем меньше количество интернализированного тау, что предполагает более высокую блокирующую активность исследуемого антитела.

За исключением hu3D6VHv1bA11/L2-DIM22, все исследованные варианты проявляли высокую степень ингибирующей активности в модели интернализации тау-белка при эквивалентной концентрации (фиг. 11 и табл. 16).

Таблица 16
Гуманизированные варианты 3D6, исследованные в клеточном анализе интернализации тау

Гуманизированный вариант 3D6	Замены тяжелой цепи относительно исходного hu3D6VHv1bA11	Замены легкой цепи относительно исходного hu3D6VLv2	Ингибирование клеточной интернализации (при концентрации антитела 133 нМ, % ингибирования от максимального сигнала флуоресценции \pm стандартное отклонение)
hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2			87,2 \pm 1,6
hu3D6VHv1bA11/L2- DIM4		L37Q_S52G_L54R	92,2 \pm 2,4
hu3D6VHv1bA11/L2- DIM5		L37Q_S52G_L54T	92,7 \pm 3,6
h3D6VHvb8/L2-DIM4	D60E	L37Q_S52G_L54R	89,4 \pm 2,6
hu3D6VHv1bA11/L2- DIM3		L37Q_S52G_L54G	87,4 \pm 3,6
hu3D6VHv1bA11/L2- DIM9		S52G	96 \pm 3,5
h3D6VHvb8/L2-DIM7	D60E	L54G	93,2 \pm 1,3
hu3D6VHv1bA11/L2- DIM22		L50G	8,7 \pm 8,6

Пример 14. Уточнение картирования эпитопа 3D6.

Первоначальное картирование пептидов показало, что эпитоп для 3D6 находится в повторе области связывания микротрубочек (MTBR, фиг. 1). Кроме того, картирование пептидов показало, что 3D6 связывается с несколькими сайтами в пределах MTBR, предполагая повторяющийся и прерывистый эпитоп.

Поскольку в исходной пептидной карте, используемой для исследований эпитопов, были использованы перекрывающиеся пептиды, которые не содержали интактных повторов связывания микротрубочек, было выполнено дополнительное картирование пептидов с отдельными интактными повторами микротрубочек. Биотинилированные пептиды, соответствующие аминокислотам для повторов 1-4 MTBR, добавляли в покрытый стрептавидином планшет для ELISA, промывали и блокировали в 1% BSA/PBS. Затем на планшете инкубировали различные количества 3D6 (в диапазоне от 50 мкг/мл до 10 нг/мл). После промывания в планшет для ELISA добавляли антитела козы к антителам мыши HRP, промывали и проявляли с использованием OPD. Поглощение определяли при 490 нм, и кривые связывания строили с использованием 4-параметрической логарифмической кривой для определения значений EC₅₀ (табл. 17). 3D6 связывает MTBR 1-3 относительно эквивалентно со значениями EC₅₀ 72,5, 35,5 и 25,1 нг/мл соответственно. Однако связывание с MTBR 4 было примерно в 60-170 раз ниже, с очевидной EC₅₀ 4309 нг/мл. Вариации последовательности повторяющегося эпитопа в MTBR 4 из MTBR 1, 2, 3 и 4 могут объяснять более слабое связывание с MTBR 4.

Таблица 17

Количество повторов микротрубочек	Аминокислоты (с применением нумерации по полноразмерной изоформе тау SEQ ID NO:1)	EC50 (нг/мл антитела)
1	244-274	72,5
2	275-305	35,5
3	306-336	25,1
4	337-368	4309

Для более точного определения конкретных аминокислот, ответственных за связывание 3D6, картирование замен с помощью микрочипа было выполнено с использованием пептида NVKSKIGSTENLKHQPG (SEQ ID NO:184), который представляет собой последовательность остатков 255-271 с использованием нумерации полноразмерной изоформы тау. В ходе анализа каждая из аминокислот в пептидной последовательности заменялась всеми 20 аминокислотами для определения корового эпитопа для 3D6 с высокой степенью точности. На микрочип нанесли все пептиды в трех повторах вместе с контрольными пептидами НА для обеспечения воспроизводимости анализа. Для проведения анализа чип инкубировали с 3D6 (10 мкг/мл) в блокирующем буфере, промывали PBS-T с последующей инкубацией с вторичными антителами козы к антителам мыши, конъюгированными с DyLight-680. Кроме того, микрочип инкубировали с анти-НА антителом 12CA5, непосредственно конъюгированным с DyLight-800. Микрочипы сканировали с помощью сканера LiCor и усредняли интенсивности в трех повторах.

Влияние замены для каждого остатка рассчитывали путем определения отношения потери связывания 3D6 при мутации нативного остатка к сумме всех остальных 19 аминокислот. Результаты представлены на фиг. 12А. Потеря связывания более 50% (пунктирная линия) означает важный остаток для связывания 3D6. Связывание пептидного зонда (остатки 255-271 изоформы из 441 а.к.) с 3D6 выявило картину замены эпитопа консервативным коровым мотивом KIGSTENLKH (SEQ ID NO:188), окруженным вариабельными N- и C-концевыми участками NVKS (SEQ ID NO:189) и QPG (SEQ ID NO:190), оба из которых не важны для связывания. В этом коровом эпитопе остатки, не допускающие замены, включают Lys⁵, Asn¹¹ и His¹⁴; кроме того, положение 13 демонстрирует пониженную устойчивость к замене для остатков, отличных от Lys и His. В дополнение к этим важным остаткам Ser₈ допускает только ограниченную замену. Это приводит к прерывистому эпитопу KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO:191), как показано на фиг. 12В.

Соответствующие участки повторов связывания микротрубочек тау представлены в выравнивании с выделенными важными связывающими остатками 3D6. По сравнению с повторами микротрубочек в тау, важные остатки присутствуют во всех повторах, за исключением предпоследнего положения в коровом эпитопе (КУН, обозначено знаком ^). В этом положении повтор 4 содержит треонин, который может отвечать за более низкое связывание 3D6 ELISA. Коровый эпитоп определен как

KIGSTENLKH (SEQ ID NO:188, остатки 259-268 в SEQ ID NO:1, в повторе 1 MBTR),

KCGSKDNIKH (SEQ ID NO:192, остатки 290-299 в SEQ ID NO:1, в повторе 2 MBTR),

KCGSLGNIHH (SEQ ID NO:193, остатки 321-330 в SEQ ID NO:1, в повторе 3 MBTR), с

более низким связыванием в

KIGSLDNITH (SEQ ID NO:194, остатки 353-362 в SEQ ID NO:1, в повторе 4 MBTR).

Пример 15. 3D6 мыши связывает образцы пациентов с болезнью Альцгеймера, иммуногистохимические эксперименты.

Блоки аутопсии свежемороженых образцов головного мозга человека (~ 0,5 г) помещали в ОСТ и разрезали с помощью криостата для получения срезов толщиной 10 мкм. Срезы помещали в раствор глюкозооксидазы и бета-D-глюкозы в присутствии азида натрия для блокирования эндогенной пероксидазы. После приготовления срезов ткани их окрашивали с применением 3D6 в указанных концентрациях с использованием антимиошиного полимера и набора для обнаружения на основе DAB (набор для обнаружения Leica BOND) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты показаны на фиг. 13.

В ткани пациентов с болезнью Альцгеймера 3D6 связывает характерные патологические признаки тау, включая нейрофибрилярные клубки, а также дистрофические нейриты. Кроме того, 3D6 связывает растворимый внутриклеточный тау; об этом свидетельствует окрашивание нормальной здоровой контрольной ткани.

Пример 16. 3D6 мыши связывает растворимые агрегаты тау, исследования с применением масс-спектрометрии сшивки MALDI с высокой массой.

Чтобы определить, связывает ли 3D6 одну или более субъединиц тау, для оценки стехиометрии связывания использовали и масс-спектрометрию сшивки MALDI с высокой массой. Сшивка позволяет проводить прямой анализ нековалентного взаимодействия. Путем смешивания образца белка, содержащего нековалентные взаимодействия, со сшивающей смесью (Bich, C et al., Anal. Chem., 2010, 82 (1), pp 172-

179), можно специфически обнаружить нековалентные комплексы с высокой чувствительностью. В этом анализе было проверено взаимодействие 3D6 с растворимыми агрегатами тау. Растворимые агрегаты тау получали инкубацией рекомбинантного полноразмерного тау с эквимольными количествами низкомолекулярного гепарина в течение 3 дней при 37°C. После инкубации нерастворимый и растворимый тау отделяли центрифугированием при 10 000 g в течение 15 мин. Затем супернатант разделяли препаративной эксклюзионной хроматографией, собирали агрегированные пики (более 100 кДа) и концентрировали.

3D6 смешивали с различными соотношениями растворимого тау-агрегата и обнаруживали с помощью масс-спектрометрии MALDI с высокой массой. Кроме того, были проведены контрольные эксперименты с отдельными компонентами, чтобы обеспечить правильную маркировку обнаруженных пиков. Анализ проводили в линейном положительном режиме с модулем взаимодействия HM4 (CovalX) со стандартным азотным лазером, с фокусировкой на диапазоне масс 0-1500 кДа.

Результаты показаны на фиг. 14. В контрольных результатах (несшитых образцов) обнаружены как тау, так и 3D6 как отдельные единицы 40,93 и 146,938 кДа соответственно. Однако при сшивании пик антитела для 3D6 исчезает, тогда как появляются два новых пика, представляющих 3D6, взаимодействующие с одним и двумя антигенами (при 194,788 и 228,963 соответственно.) Как обнаружено при наложении, пик 3D6 при 146,938 кДа заметно отсутствует в сшитых образцах. Эти данные предполагают, что 3D6 очень прочно связывает растворимые агрегаты тау и осуществляет это посредством связывания одного или двух комплексов на одно антитело.

Пример 17. 3D6 мыши прерывает образование зерен тау в модели патологии болезни Альцгеймера *in vivo*.

Способность 3D6 прерывать образование тау была исследована на модели распространения патологии БА *in vivo*. Патологические зерна получали с использованием гомогенатов ствола мозга мышей hTauP301L на конечной стадии или контрольных мышей дикого типа. Чтобы вызвать патологию, зерна вводили в одну сторону в гиппокамп 3,5-месячных мышей, задолго до начала прогрессирования естественной патологии. Чтобы проверить способность антител влиять на образование зерен тау, антитела предварительно инкубировали перед инъекцией. Через один месяц количество зерен на ипсилатеральной стороне мышей оценивали по иммунореактивности AT8; определяли количество нейронов на срезе в гиппокампе.

Результаты показаны на фиг. 15. По сравнению с изотипическим контролем, предварительная инкубация зерен тау с 3D6 смогла значительно уменьшить количество зерен, обнаруженных у мышей через один месяц, что свидетельствует о прерывании интернализации тау проксимально от места инъекции и предполагает, что 3D6 может ухудшать поглощение и увеличение количества тау.

Пример 18. 3D6 мыши и гуманизированные варианты прерывают взаимодействие тау с гепарином *in vitro*.

Несколько исследований показывают, что интернализация тау в клетки опосредуется начальным взаимодействием тау с поверхностно-ассоциированными гепаринсульфатными протеогликанями (HSPG), и что это взаимодействие является важным начальным этапом, ведущим к поглощению, образованию зерен и размножению тау-белка (Holmes et al., PNAS, 110(33), 2013; Katsinelos et al., Cell Rep, 23, 2018). Следовательно, благоприятным свойством терапевтического антитела против тау будет способность блокировать взаимодействие между тау и гепарином, которое может присутствовать на поверхности клеток.

Чтобы проверить способность мышинового и гуманизированного вариантов 3D6 прерывать взаимодействие тау с гепарином, планшеты для ELISA, покрытые низкомолекулярным гепарином, сначала блокировали 2% BSA в PBS в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали посредством TBST. После блокирования планшеты инкубировали с биотинилированным рекомбинантным тау вместе с указанными концентрациями немеченого антитела в 1% BSA/PBS в течение одного часа при комнатной температуре. Планшеты снова промывали, и затем инкубировали со стрептавидин-HRP в 0,1% BSA/PBS в течение 45 мин. Затем планшеты промывали и проявляли с помощью OPD, оптическую плотность измеряли при 490 нм. Кривые ингибирования анализировали с использованием 4-параметрической логарифмической аппроксимации.

Результаты показаны на фиг. 16 и в табл. 18. Мыши, а также обе гуманизированные формы 3D6, протестированные в анализе, показали способность блокировать взаимодействие тау/гепарин, что указывает на то, что эпитоп 3D6 важен для этого взаимодействия, и что антитела способны ингибировать данное взаимодействие. Это предполагает способность прерывать захват тау клетками. Хотя все протестированные антитела проявляли ингибирующую активность, вариант hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 сохранял активность ближе к мышинной форме антитела ($IC_{50}=422,7$ пМ по сравнению с 409,2 пМ для мышинной формы). В отличие от этого, hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 продемонстрировал более низкую ингибирующую активность ($IC_{50}=564,6$ пМ) по сравнению с hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4, что указывает на то, что hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 имеет более высокую степень сохранения свойств мышинового антитела, и свидетельствует о повышении ингибирующей активности hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4, из-за вариантов аминокислот в CDR легкой цепи.

Таблица 18

Антитело	IC50 (pM)
мышинное 3D6	409,2
hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	564,6
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	422,7

Пример 19. Гуманизированные варианты 3D6 связывают фибриллярные формы тау.

Рекомбинантные тау-фибриллы получали либо путем инкубации с эквимоллярными количествами низкомолекулярного гепарина, либо с тау с 4-повторами ("фибриллярный тау"), либо с помощью выращивания с затравкой тау с 3 и 4 повторами ("смешанные фибриллы"). Тау инкубировали в течение 3-5 дней при 37°C. Для выделения фибрилл подготовленные образцы ультрацентрифугировали при 100000 g в течение 30 мин. Гранулы ресуспендировали в исходном объеме перед хранением при -80°C перед использованием.

Планшеты для ELISA покрывали предварительно сформированными фибриллами (в течение ночи при 4°C в 50 mM карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,6), промывали и блокировали 1% BSA в PBS. После блокирования планшеты инкубировали с указанными концентрациями биотинилированного первичного антитела в 0,1% BSA/PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали и затем инкубировали со стрептавидин-HRP в 0,1% BSA/PBS в течение 45 мин. Затем планшеты промывали и проявляли с помощью OPD, поглощение измеряли при 490 нм. Кривые связывания анализировали с использованием 4-параметрической логарифмической аппроксимации.

Результаты показаны на фиг. 17 и в табл. 19. Обе гуманизированные формы 3D6, исследованные в анализе, показали сильное связывание с фибриллярными формами тау, независимо от того, содержат ли фибриллы только тау 4R или оба тау 3R и 4R. Вариант hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 показал предпочтение связывания с обоими видами ($EC_{50}=191,8$ пМ) по сравнению с hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 ($EC_{50}=236,7$ пМ), что указывает на улучшение связывающей способности hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 из-за вариантов аминокислот в CDR легкой цепи.

Таблица 19

Антитело	Связывание с фибриллами 4R тау: EC50 (пМ)
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	191,8
hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	236,7

Пример 20. Иллюстративные CDR.

Иллюстративные CDR антител согласно настоящему изобретению представлены в табл. 20.

Таблица 20
Иллюстративные CDR

CDR и определение	Аминокислотная последовательность CDR	SEQ ID NO:	Примерная VH или VL, в которых присутствует CDR
HCDR1 по Кэботу/Чотиа	GFNIKDYYLH	8	мышинная 3D6 VH
HCDR2 по Кэботу	WIDPENGDTVYDPKFG	9	мышинная 3D6 VH
HCDR3: по Кэботу	LDF	10	мышинная 3D6 VH
LCDR1 по Кэботу	KSSQSLDSDGKTYLN	12	мышинная 3D6 VL
LCDR2 по Кэботу	LVSKLDS	13	мышинная 3D6 VL
LCDR3: по Кэботу	WQGTHFPYT	14	мышинная 3D6 VL
CDR-H1 по Кэботу	DYYLH	32	мышинная 3D6 VH
CDR-H1 по Чотиа	GFNIKDY	33	мышинная 3D6 VH
CDR-H2 по Чотиа	DPENGD	34	мышинная 3D6 VH
CDR-H2 AbM	WIDPENGDTV	35	Mouse 3D6 VH
CDR-L1 согласно контактному определению	KTYLNWL	36	мышинная 3D6 VL

CDR-L2 согласно контактному определению	RLIYLVSKLD	37	мышинная 3D6 VL
CDR-L3 согласно контактному определению	WQGTHFPY	38	мышинная 3D6 VL
CDR-H1 C согласно контактному определению ontact	KDYYLH	39	мышинная 3D6 VH
CDR-H2 согласно контактному определению	WIGWIDPENGDTV	40	мышинная 3D6 VH
CDR-H3 согласно контактному определению	STLD	41	мышинная 3D6 VH
CDR-H1 по Кэботу-Чотиа CDR-H1	GFTIKDYYLH	42	hu3D6VHv5, hu3D6VHv1bA11B6G2, hu3D6VHv1bA11B6H3, hu3D6VHv1e и hu3D6VHv1f
CDR-H2 по Кэботу	WIDPEDGDTVYAPKFQG	43	hu3D6VHv5 и hu3D6VHv1bA11B6H3
CDR-H1 по Кэботу-Чотиа	GFNFKDYYLH	58	hu3D6VH1c
CDR-H1 по Кэботу-Чотиа	GYTFTDYYLH	59	hu3D6VHv1d, hu3D6VHv3c и hu3D6VHv4c
CDR-H1 по Кэботу-Чотиа	GYNFKDYYLH	60	hu3D6VHv3b и hu3D6VHv4b

CDR-H2 по Кэботу	WVDPEDGDTVYAPKFQG	61	hu3D6VHv1bA11B6G2
CDR-H2 по Кэботу	WIDPENGDTVYDEKFQG	62	hu3D6VHv1c, hu3D6VHv3b и hu3D6VHv4b
CDR-H2 по Кэботу	WVDPEDGDTVYAEKFQG	63	hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3c и hu3D6VHv4c
CDR-H2 по Кэботу	WIDPENGDTVYAEKFQG	64	hu3D6VHv1e
CDR-H3 по Кэботу	LDY	65	hu3D6VHv1f
Согласно сводному определению Кэбота-Чютиа CDR-H1	GLNIKDYIИH	67	мышинная 6A10 VH
CDR-H2 по Кэботу	WIDPENDDTEYAPKFQG	68	мышинная 6A10 VH
CDR-H3 по Кэботу	LDY	69	мышинная 6A10 VH
Согласно сводному определению Кэбота-Чютиа CDR-H1	GFTIKDYIYLH	86	hu3D6VHvb4 и hu3D6VHvb5
CDR-H2 по Кэботу	WIDPENGDTIYDPKFQG	87	hu3D6VHvb3 и hu3D6VHvb4
CDR-H2 по Кэботу	WIDPEDGETIYDPKFQG	88	hu3D6VHvb5
CDR-L1 по Кэботу	RSSQSLLDSDGKTYLN	89	hu3D6VLvb3

CDR-H2 по Кэботу	WIDPEDGETVYDPKFQG	92	hu3D6VHvb6 и hu3D6VHvb7
CDR-H2 по Кэботу	WIDPENGDTVYEPKFQG	149	h3D6VHvb8 и h3D6VHvb9
CDR-L2 по Кэботу	LVSKDDS	150	hu3D6VLv2 L54D и hu3D6VLv2 L37Q_L54D
CDR-L2 по Кэботу	LVSKGDS	151	hu3D6VLv2 L54G и hu3D6VLv2 L37Q_L54G
CDR-L2 по Кэботу	LVSKNDS	152	hu3D6VLv2 L54N
CDR-L2 по Кэботу	LVSKEDS	153	hu3D6VLv2 L54E и hu3D6VLv2 L37Q_L54E
CDR-L2 по Кэботу	EVSKLDS	154	hu3D6VLv2 L50E
CDR-L2 по Кэботу	LVSKQDS	155	hu3D6VLv2 L54Q
CDR-L2 по Кэботу	DVSKLDS	156	hu3D6VLv2 L50D и hu3D6VLv2 L37Q_L50D
CDR-L2 по Кэботу	LVSKKDS	157	hu3D6VLv2 L54K
CDR-L2 по Кэботу	LVSKRDS	158	hu3D6VLv2 L54R и hu3D6VLv2 L37Q_L54R
CDR-L2 по Кэботу	LVSKTDS	159	hu3D6VLv2 L54T и hu3D6VLv2 L37Q_L54T
CDR-L2 по Кэботу	GVSKLDS	160	hu3D6VLv2 L50G и hu3D6VLv2 L37Q_L50G
CDR-L2 по Кэботу	LVSKVDS	161	hu3D6VLv2 L54V
CDR-L2 по Кэботу	LVSKSDS	162	hu3D6VLv2 L54S

CDR-L2 по Кэботу	LVGKLDS	163	hu3D6VLv2 S52G и hu3D6VLv2 L37Q_S52G
CDR-L2 по Кэботу	VVSKLDS	164	hu3D6VLv2 L50V
CDR-L2 по Кэботу	GVSKRDS	165	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R и hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q
CDR-L2 по Кэботу	GVSKGDS	166	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G и hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q
CDR-L2 по Кэботу	LVGKGDS	167	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G
CDR-L2 по Кэботу	LVGKRDS	168	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R и hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q
CDR-L2 по Кэботу	LVGKTDS	169	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T
CDR-L2 по Кэботу	LVGKDDS	170	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D и hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q
CDR-L2	DVSKGDS	171	в hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G и hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q
CDR-L2 по Кэботу	DVSKRDS	172	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R и hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q
CDR-L2 по Кэботу	EVSKGDS	173	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G
CDR-L2 по Кэботу	EVSKRDS	174	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R
CDR-L2 по Кэботу	VVSKDDS	175	hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q

Перечень последовательностей

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTIPEGTTAE EAGIGDTP
 SLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANAT
 RIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREP KKVAVVRT
 PPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQSKC
 GSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDR
 VQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLS
 NVSSTGSIDMVDSPLATLADEV SASLAKQGL

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAE EAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK
 KAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSP
 GSPGTPGSRSRTPSLTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIG
 STENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT
 KCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFR
 ENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPLATLADEV SASLAK
 QGL

P10636-6 (4RON тау человека) (SEQ ID NO:3)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEEAGIGD
 TPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQAN
 ATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREP KKVAVV
 RTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQS
 KCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FK
 DRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPR
 HLSNVSSTGSIDMVDSPLATLADEV SASLAKQGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHEIPEGTTAEAGIGDTP
 SLEDEAAGHVTVQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANAT
 RIPA KTPPAKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRT
 PPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVTSK
 CGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRE
 NAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQ
 GL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTVQARMVSKSKDGTGSDDK
 KAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIPAKTPPAKTPPSSGEPKSGDRSGYSSP
 GSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIG
 STENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRV
 QSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSN
 VSSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEAGIGD
 TPSLEDEAAGHVTVQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQAN
 ATRIPAKTPPAKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVV
 RTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVTS
 KCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFR
 ENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAK
 QGL

SEQ ID NO:7; аминокислотная последовательность VH мышиного 3D6:

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPE
 NGDVTYDPKFKGATITADTSSNTAYLQLGSLTSED TAVYFCSTLDFWQGTTLVSS

SEQ ID NO:8; HCDR1 по Кэботу/Чотиа:

GFNIKDYLLH

SEQ ID NO:9; HCDR2 по Кэботу:

WIDPENGDTVYDPKFKG

SEQ ID NO:10; HCDR3 по Кэботу:

LDF

SEQ ID NO:11; аминокислотная последовательность VL мышиного 3D6:

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
SKLDSGVPDRFTSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:12; LCDR1 мыши по Кэботу:

KSSQSLDSDGKTYLN

SEQ ID NO:13; LCDR2 мыши по Кэботу:

LVSKLDS

SEQ ID NO:14; LCDR3 мыши по Кэботу:

WQGFHPYT

SEQ ID NO:15; hu3D6VHv1:

EVQLVQSGAEVVRPGALVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPEQGLEWIGWIDP
ENGDVYDPKFKGKATITADTSTNTAYLQLSSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:16; hu3D6VHv2:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGFNIDYLLHWVRQAPEQGLEWMGWID
PENGDTVYDPKFKGRVTITADTSTNTAYMELSSLTSEDVAVYYCSTLDFWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:17; hu3D6VHv1b:

EVQLVQSGAEVVRPGALVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFKGKATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:18; hu3D6VHv1bA11:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPGQGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFKGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:19; hu3D6VHv5:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPGQGLEWIGWIDPE
DGDVYAPKFKGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:20; hu3D6VLv1:

DVVMTQSPLSPLVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
VSKLDSGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:21; hu3D6VLv2:

DVVMTQSPLSLPVTGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQSPRRLIYLV
VSKLDSGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:22; hu3D6VLv3:

DVVMTQSPLSLPVTGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQSPRRLIYLV
VSKLDSGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:23; hu3D6VLv4:

DIVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSFTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:24 ; переменный акцептор тяжелой цепи Асс.# BAC01986.1

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFGSYAIWVRQAPGGLEWMGRIPI
LGIATYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRSEDTAVYYCARGKGEFEGMDVWGQ
TTVTVSS

SEQ ID NO:25 ; переменный акцептор тяжелой цепи Асс.# IMGT# IGHV1-
69-2*01

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDYMHVWVQAPGGLEWMGLVD
PEDGETIYAEKFGGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT

SEQ ID NO:26 ; переменный акцептор тяжелой цепи Асс.#
IMGT#IGKJ1*01

QHWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:27; переменный акцептор легкой цепи Асс. # IMGT#IGKV2-
30*02 Асс. # IMGT#IGKV2-30*02

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYK
VSNRDSGVPDRFSGSGSFTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGFHW

SEQ ID NO:28 ; переменный акцептор легкой цепи Асс. # IMGT#IGKJ2*01

YTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:29; переменный акцептор легкой цепи Асс. # AAZ09048.1

DVVMTQSPLSLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYR
VSHWDSGVPDRFSGSGSFTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTWPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:30 ; нуклеотидная последовательность VH мышиного 3D6:

GAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGGGCTGACCTTGTGAGGCCAGGGCCTTAG
TCAAGTTGCTCCTGCAAAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACTACTATTTGCACTGGG
TGAGGCAGAGGCCTGAACAGGGCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAAT
GGTGATACTGTATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACAC
ATCCTCCAATACAGCCTACCTGCAGCTCGGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGT
CTATTTCTGTTCTACCCTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:31; нуклеотидная последовательность VL мышиного 3D6:

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCTGGTTACCATTGGACAACC
 AGCCTCCATCTCTTGC AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATA
 TTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGT
 GTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCT
 GGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
 CGT

SEQ ID NO:32; CDR-H1 мыши по Кэботу

DYYLH

SEQ ID NO:33; CDR-H1 мыши по Чотиа

GFNIKDY

SEQ ID NO:34; CDR-H2 мыши по Чотиа

DPENGD

SEQ ID NO:35; CDR-H2 мыши AbM

WIDPENGDTV

SEQ ID NO:36; CDR-L1 мыши согласно контактному определению

KTYLNWL

SEQ ID NO:37; CDR-L2 мыши согласно контактному определению

RLIYLVSKLD

SEQ ID NO:38; CDR-L3 мыши согласно контактному определению

WQGTHFPY

SEQ ID NO:39; CDR-H1 мыши согласно контактному определению

KDYYLH

SEQ ID NO:40; CDR-H2 мыши согласно контактному определению

WIGWIDPENGDTV

SEQ ID NO:41; CDR-H3 мыши согласно контактному определению

STLD

SEQ ID NO:42; Альтернативная CDR-H1 согласно Кэботу-Чотиа

GFTIKDYYLH

SEQ ID NO:43; Альтернативный CDR-H2 согласно Кэботу

WIDPEDGDTVYAPKFQG

SEQ ID NO:44; консенсусная аминокислотная последовательность VH из

Фигуры 2 PCT/IB2017/052544

EVQLVQSGAEVVPXGALVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPE
 NGDTVYDPKFGQXATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWVGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:45; консенсусная аминокислотная последовательность VL из
 Фигуры 3 PCT/IB2017/052544

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYL
 VSKLDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHFPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:46; hu3D6VHv1bA11B6G2:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPGKGLEWIGWVDP
 EDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLELGLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:47; hu3D6VHv1bA11B6H3:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPGKGLEWIGWIDPE
 DGDVTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLELGLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:48; hu3D6VHv1c:

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGFNFKDYLLHWVRQRPEQGLEWIMGWIDP
 ENGDTVYDEKFKQGRVTITADTSTNTAYLQLGLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:49; hu3D6VHv1d:

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGYTFTDYLLHWVRQRPEQGLEWIMGWVD
 PEDGDTVYAEKFKQGRVTITADTSTNTAYLQLGLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS
 S

SEQ ID NO:50; hu3D6VHv1e:

EVQLVQSGADVvkPGALVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPE
 NGDTVYAEKFKQGRVTITADTSTNTAYLeLGLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:51; hu3D6VHv1f:

EVQLVQSGADVvkPGALVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPGQGLEWIGWVDP
 EDGDTVYAEKFKQGRVTITADTSTDTAYMELGLTSEDVAVYFCSTLDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:52; hu3D6VHv3:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDYYLHWVRQAPGKGLEWIMGWIDP
 ENGDTVYDPKFKQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:53; hu3D6VHv3b:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYNFKDYLLHWVRQAPGKGLEWIMGWID
 PENGDTVYDEKFKQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTTLTV
 SS

SEQ ID NO:54; hu3D6VHv3c:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYTFTDYLLHWVRQAPGKGLEWIMGWVD
 PEDGDTVYAEKFKQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTTLTV
 SS

SEQ ID NO:55; hu3D6VHv4:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKVSGFNKDYYLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
 NGDTVYDPKFKGKATITADTSTNTAYLELGLTSEDVAVYYCSTLDFWGGTLVTVSS

SEQ ID NO:56; hu3D6VHv4b:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYNFKDYYLHWVRQRPKGKLEWMGWID
 PENGDTVYDEKFKQGRVTITADTSTDTAYLELGLTSEDVAVYYCSTLDFWGGTLVTVS
 S

SEQ ID NO:57; hu3D6VHv4c:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYTFTDYLLHWVRQRPKGKLEWMGWVD
 PEDGDTVYAEKFKQGRVTITADTSTDTAYLELGLTSEDVAVYYCSTLDFWGGTLVTVS
 S

SEQ ID NO:58; Альтернативный CDR-H1 согласно Кэботу-Чотиа, (как в
 hu3D6VH1c).

GFNFKDYYLH

SEQ ID NO:59; Альтернативный CDR-H1 согласно Кэботу-Чотиа, (как в
 hu3D6VHv1d, hu3D6VHv3c и hu3D6VHv4c).

GYTFTDYLLH

SEQ ID NO:60; Альтернативный CDR-H1 согласно Кэботу-Чотиа, (как в
 hu3D6VHv3b и hu3D6VHv4b)

GYNFKDYYLH

SEQ ID NO:61; Альтернативный CDR-H2 согласно Кэботу (как в
 hu3D6VHv1bA11B6G2).

WVDPEDGDTVYAPKFQG

SEQ ID NO:62; Альтернативный CDR-H2 согласно Кэботу (как в
 hu3D6VHv1c, hu3D6VHv3b и hu3D6VHv4b).

WIDPENGDTVYDEKFKQG

SEQ ID NO:63; Альтернативный CDR-H2 согласно Кэботу как в
 hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3c и hu3D6VHv4c).

WVDPEDGDTVYAEKFKQG

SEQ ID NO:64; Альтернативный CDR-H2 согласно Кэботу (как в
 hu3D6VHv1e).

WIDPENGDTVYAEKFKQG

SEQ ID NO:65; Альтернативный CDR-H3 согласно Кэботу (как в
 hu3D6VHv1f)

LDY

SEQ ID NO:66; переменная область тяжелой цепи антитела 6A10 мыши.

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
 NDDTEYAPKFQGRATLTTDSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTPLDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO:67; CDR-H1 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа
 антитела 6A10 мыши.

GLNIKDYYIH

SEQ ID NO:68; CDR-H2 согласно Кэботу антитела 6A10 мыши.

WIDPENDDTEYAPKFQG

SEQ ID NO:69; Kabat CDR-H3 антитела 6A10 мыши

LDY

SEQ ID NO:70; Mus VH структурная матрица (PDB#1CR9_H)

KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
 NGNSEYAPRFQGGKATMTADTSLNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNADLHDIYWGQGTTLT
 VSS

SEQ ID NO:71; консенсусная аминокислотная последовательность VH из
 Фигур 4A и 4B из PCT/IB2017/052544

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKASGFNIKDYIHWVVRQRPGGLEWIGWIDPE
 NGDVTYDPKFQGRVTITADTSTNTAYLELGLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTLTVTVSS

SEQ ID NO:72; тяжелая цепь химерного антитела 3D6

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVVRQRPEQGLEWIGWIDPE
 NGDVTYDPKFQGGKATITADTSSNTAYLQLGLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSSA
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:73; легкая цепь химерного антитела 3D6

DVVMVTQPLTSLVITIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
 SKLDGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:74; аминокислотная последовательность структурной модели
 переменной области тяжелой цепи Acc.# 5MYX-VH_mSt

EVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYIFNNYWINWVKQRPGQGLEWIGQIYPG
DGDNTYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREGYIVYWGQGLT
VSA

SEQ ID NO:75; аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи акцептора Acc.# 2RCS-VH_huFrwk

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPA
NGNTKYDPKFKGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCASYYGIYWGQTTLTVS
S

SEQ ID NO:76; аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного 3D6 антитела hu3D6VHvb1

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYHLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGDVTYDPKFKGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGLTTLTVSS

SEQ ID NO:77; аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного 3D6 антитела hu3D6VHvb2

EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRPGKGLEWIGWIDPE
NGDVTYDPKFKGRATITADTSTDYALELSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGLTTLTVSS

SEQ ID NO:78; аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного 3D6 антитела hu3D6VHvb3

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRPGKGLEWIGWIDPE
NGDTIYDPKFKGRATITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGLTTLTVSS

SEQ ID NO:79; аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного 3D6 антитела hu3D6VHvb4

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYHLHWVRQRPGKGLEWIGWIDPE
NGDTIYDPKFKGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGLTTLTVSS

SEQ ID NO:80; аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного 3D6 антитела hu3D6VHvb5

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYHLHWVRQRPGKGLEWIGWIDPE
DGETIYDPKFKGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGLTTLTVSS

SEQ ID NO:81; аминокислотная последовательность структурной модели варибельной области легкой цепи Acc.# 5MYX-VL_mSt

DVVLQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQLLYSNGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYVV
SKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGFTHFPFTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO:82; аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи акцептора Acc.# ARX71335-VL_huFrwk

DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCEQGFHPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:83; аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизованного 3D6 антитела hu3D6VLvb1

DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCWQGFHFPYTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:84; аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизованного 3D6 антитела hu3D6VLvb2

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHFPYTFGAGTKLEIK

SEQ ID NO:85; аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизованного 3D6 антитела hu3D6VLvb3

DVVMTQSPLSLSVTLGEPASISCRSSQSLSDGKTYLNWLQRPQSPRRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:86; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-H1 согласно сводному определению Кэбота-Чотиа гуманизованного антитела 3D6 (как в hu3D6VHvb4 и hu3D6VHvb5)

GFTIKDYLLH

SEQ ID NO:87; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-H2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VHvb3 и hu3D6VHvb4)

WIDPENGDTIYDPKFQG

SEQ ID NO:88; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-H2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VHvb5)

WIDPEDGETIYDPKFQG

SEQ ID NO:89; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L1 по Кэботу гуманизованного 3D6 антитела (как в hu3D6VLvb3)

RSSQSLSDGKTYLN

SEQ ID NO:90; аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизованного 3D6 антитела hu3D6VHvb6

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
DGETVYDPKFQGRVTITADTSTDAYMELSSLRSEDNAVYFCSTLDFWGGTLVTVSS

SEQ ID NO:91; аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизованного 3D6 антитела hu3D6VHvb7

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
DGETVYDPKFQGRVTITADTSTDAYMELSSLRSEDNAVYYCSTLDFWGGTLVTVSS

SEQ ID NO:92; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-H2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VHvb6 и hu3D6VHvb7)

WIDPEDGETVYDPKFQG

SEQ ID NO:93; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L54D, также известная как L2-DIM21

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYL
VSKDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:94; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L54G, также известная как L2-DIM7

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYL
VSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:95; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L45N

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYL
VSKNDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:96; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L54E

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYL
VSKEDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:97; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L50E

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYE
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:98; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L54Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYL
VSKQDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:99; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L50D

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYD
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:100; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L54K

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYL
VSKKDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:101; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L54R

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYL
VSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:102; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L54T

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYL
VSKTDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:103; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L50G, также известная как L2-DIM22

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYG
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:104; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
I48G

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLGYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:105; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
I48D

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLDYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:106; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L47G

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRGIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:107; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
Y49E

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIELV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:108; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L54V

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYL
VSKVDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:109; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L54S

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:110; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
S52G, также известная как L2-DIM9

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:111; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L47N

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRNIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:112; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L47D

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRDIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:113; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L47E

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRREIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:114; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L47P

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRPIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:115; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L47T

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRTIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:116; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L47S

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRSIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:117; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L47A

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRAIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:118, переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L50V

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYV
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:119; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_L50G_L54R, также известная как L2-DIM1

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQRPQGSPRRLIYG
VSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:120; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_L50G_L54G, также известная как L2-DIM2

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQRPQGSPRRLIYE
VSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:121; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_S52G_L54G, также известная как L2-DIM3

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQRPQGSPRRLIYL
VGKDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:122; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_S52G_L54R, также известная как L2-DIM4

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQRPQGSPRRLIYL
VGKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:123; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_S52G_L54T, также известная как L2-DIM5

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQRPQGSPRRLIYL
VGKTDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:124; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_S52G_L54D, также известная как L2-DIM6

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQRPQGSPRRLIYL
VGKDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:125; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_L54R

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQRPQGSPRRLIYL
VSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:126; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_L54G

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYL
VSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:127; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L37Q_L54D, также известная как L2-DIM12

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYL
VSKDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:128; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L37Q_L50G, также известная как L2-DIM13

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYG
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:129; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L37Q_L50D, также известная как L2-DIM14

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYD
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:130; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L37Q_L54T

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYD
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:131; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L37Q_S52G

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:132; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L37Q_L50D_L54G, также известная как L2-DIM17

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYD
VSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:133; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L37Q_L50D_L54R, также известная как L2-DIM18

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYD
VSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:134; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L37Q_L50E_L54G, также известная как L2-DIM19

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYE
VSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:135; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_L50E_L54R, также известная как L2-DIM20

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYE
VSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:136; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_L50G_L54R_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYG
VSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:137; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_L50G_L54G_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYG
VSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:138; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_S52G_L54R_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYL
VSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:139; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_S52G_L54D_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYL
VSKDDSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:140; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_L50D_L54G_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYD
VSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:141; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_L50D_L54R_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYD
VSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:142; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q_L50V_L54D_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYV
VSKDDSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:143; переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта L37Q, также известная как L2-DIM8

DVVMTQSPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:144 переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
G100Q

DVVMTQSPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQQRPGQSPRRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:145 переменная область легкой цепи hu3D6VLv2 варианта
L37Q_L54E

DVVMTQSPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYL
VSKEDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:146; переменная область тяжелой цепи hu3D6VHv1bA11
варианта D60E, также известная как h3D6VHvb8

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPQGQLEWIGWIDPE
NGDTVYEPKFQGRATITADTSTDYALQLGSLTSEDYAVYFCSTLDFWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:147 переменная область тяжелой цепи hu3D6VHv1bA11
варианта L82cV

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPQGQLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFQGRATITADTSTDYALQLGSLTSEDYAVYFCSTLDFWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:148; переменная область тяжелой цепи hu3D6VHv1bA11
варианта D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R, также известная как h3D6VHvb9

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPQGQLEWIGWIDPE
NGDTVYEPKFQGRATITADTSTDYALMELGSRSEDTAVYFCSTLDFWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:149; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-
H2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в h3D6VHvb8 и в h3D6VHvb9)

WIDPENGDTVYEPKFQG

SEQ ID NO:150; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-
L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L54D и в hu3D6VLv2
L37Q_L54D):

LVSKDDS

SEQ ID NO:151; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-
L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L54G и в hu3D6VLv2
L37Q_L54G):

LVSKGDS

SEQ ID NO:152; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-
L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L54N):

LVSKNDS

SEQ ID NO:153; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L54E и в hu3D6VLv2 L37Q_L54E):

LVSKEDS

SEQ ID NO:154; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L50E):

EVSKLDS

SEQ ID NO:155; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L54Q):

LVSKQDS

SEQ ID NO:156; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L50D и в hu3D6VLv2 L37Q_L50D):

DVSKLDS

SEQ ID NO:157; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L54K):

LVSKKDS

SEQ ID NO:158; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L54R и в hu3D6VLv2 L37Q_L54R):

LVSKRDS

SEQ ID NO:159; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L54T и в hu3D6VLv2 L37Q_L54T):

LVSKTDS

SEQ ID NO:160; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L50G и в hu3D6VLv2 L37Q_L50G):

GVSKLDS

SEQ ID NO:161; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L54V):

LVSKVDS

SEQ ID NO:162; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L54S):

LVSKSDS

SEQ ID NO:163; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 S52G и в hu3D6VLv2 L37Q_S52G):

LVGKLDS

SEQ ID NO:164; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L50V):

VVSKLDS

SEQ ID NO:165; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R и hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q):

GVSKRDS

SEQ ID NO:166; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G и в hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q):

GVSKGDS

SEQ ID NO:167; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G):

LVGKGDS

SEQ ID NO:168; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R и в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q):

LVGKRDS

SEQ ID NO:169; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T):

LVGKTDS

SEQ ID NO:170; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D и в hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q):

LVGKDDS

SEQ ID NO:171; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G и в hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q):

DVSKGDS

SEQ ID NO:172; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R и в hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q):

DVSKRDS

SEQ ID NO:173; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G):

EVSKGDS

SEQ ID NO:174; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R):

EVSKRDS

SEQ ID NO:175; аминокислотная последовательность альтернативной CDR-L2 гуманизованного антитела 3D6 по Кэботу (как в hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q):

VVSKDDS

SEQ ID NO:176; аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи (IgG1: аллотип G1m17,1):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:177; аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (каппа):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYFREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:178; аминокислотная последовательность зрелой тяжелой цепи гуманизованного варианта 3D6 (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 аллотип)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLHWVRQRPQGQLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFKQGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDYAVYFCSTLDFWQGTSLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:179; аминокислотная последовательность зрелой легкой цепи гуманизированного варианта 3D6 (hu3D6VLv2 вариант L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 каппа)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYL
VGKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHFPYTFGGGKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:180; аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного варианта 3D6 (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 аллотип) с сигнальным пептидом бычьего альфа-лактальбумина на N-конце

MMSFVSLLLVGILFHATQAEVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLH
WVRQRPQGQLEWIGWIDPENGDTVYDPKQGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDYAV
YFCSTLDFWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKQVE
PKSCDKTHTCPPAPPELLGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:181; аминокислотная последовательность легкой цепи гуманизированного варианта 3D6 (hu3D6VLv2 вариант L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 каппа) с сигнальным пептидом бычьего альфа-лактальбумина на N-конце.

MMSFVSLLLVGILFHATQADVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKT
YLNWLQQRPGQSPRRLIYLVGKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW
QGFHFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

SEQ ID NO:182; последовательность нуклеотидов, кодирующая тяжелую цепь гуманизированного варианта 3D6 (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 аллотип) с сигнальным пептидом бычьего альфа-лактальбумина на N-конце

ATGATGTCCTTTGTCTCTCTGCTCCTGGTTGGCATCCTATTCCATGCCACCCAG
GCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTTGTGAAGCCAGGGGCCACAGT
CAAGATCTCCTGTAAGGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACTACTATCTGCACTGGGT
GCGGCAGAGGCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATG

GTGATACTGTGTATGACCCGAAGTTCCAGGGCAGGGCCACTATAACAGCAGACACA
 TCCACCGACACAGCCTACCTGCAGCTCGGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTC
 TATTTCTGTTCTACCCTGGACTTCTGGGGCCAAGGCACCCTTGTCACAGTCTCCTCAG
 CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTAGCAAGAGCACCTCTG
 GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
 GTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTA
 CAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
 CAAGAAGGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCAG
 CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACA
 CCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
 AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCGAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCT
 CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
 ACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
 CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCA
 GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
 GGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACT
 CCGACGGCTCCTTCTTCTATTTCCAAACTACCCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
 AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAATGATGAGATCTCGAG

SEQ ID NO:183; последовательность нуклеотидов, кодирующая легкую цепь
 гуманизованного варианта 3D6 (hu3D6VLv2 вариант L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4
 каппа) с сигнальным пептидом бычьего альфа-лактальбумина на N-конце

ATGATGTCCTTTGTCTCTCTGCTCCTGGTTGGCATCCTATTCCATGCCACCCAG
 GCCGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCTTTGCCGTTACCCTTGGACAACCTG
 CCTCCATCTCTTGAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATT
 TGAATTGGTTGCAACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCACGGCGCCTAATCTATCTGGTGG
 GCAAACGGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT
 TTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTATTGCTG
 GCAAAGGCACACATTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAC
 GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGCTTAAGT
 CCGGAACTGCTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
 TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACACA
 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAA

AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA
GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGTGAGATCTCGAG

SEQ ID NO:184; аминокислотная последовательность повтора области связывания микротрубочек тау 1 (остатки аминокислот 255-271 в SEQ ID NO:1)

NVSKKIGSTENLKHQPG

SEQ ID NO:185; аминокислотная последовательность повтора области связывания микротрубочек тау 2 (остатки аминокислот 286-302 of SEQ ID NO:1)

NVQSKCGSKDNIKHVPG

SEQ ID NO:186; аминокислотная последовательность повтора области связывания микротрубочек тау 3 (остатки аминокислот 317-333 of SEQ ID NO:1)

KVTSKCGSLGNIHHKPG

SEQ ID NO:187; аминокислотная последовательность повтора области связывания микротрубочек тау 4 (остатки аминокислот 349-365 of SEQ ID NO:1)

RVQSKIGSLDNITHVPG

SEQ ID NO:188; аминокислотная последовательность корового мотива тау, связанного с 3D6

KIGSTENLKH

SEQ ID NO:189; аминокислотная последовательность N-конца последовательности тау по отношению к коровому мотиву тау, связанному с 3D6

NVKS

SEQ ID NO:190; аминокислотная последовательность C-конца последовательности тау по отношению к коровому мотиву тау, связанному с 3D6

QPG

SEQ ID NO:191; аминокислотная последовательность эпитопа 3D6

KXXSXXNX(K/H)H

SEQ ID NO:192; аминокислотная последовательность корового мотива тау, связанного с 3D6

KCGSKDNIKH

SEQ ID NO:193; аминокислотная последовательность корового мотива тау, связанного с 3D6

KCGSLGNIHH

SEQ ID NO:194; аминокислотная последовательность корового мотива тау, связанного с 3D6

KIGSLDNITH

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, специфично связывающееся с тау-белком человека, содержащее: зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, которая содержит SEQ ID NO: 8, CDR-H2, которая содержит SEQ ID NO: 9, и CDR-H3, которая содержит SEQ ID NO: 10, при этом переменная область тяжелой цепи является по меньшей мере на 90% идентичной с SEQ ID NO: 18; и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, которая содержит SEQ ID NO: 12, CDR-L2, которая содержит SEQ ID NO: 168, и CDR-L3, которая содержит SEQ ID NO: 14, при этом переменная область легкой цепи является по меньшей мере на 90% идентичной с SEQ ID NO: 122.
2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из положений H12, H13, H17, H24, H40, H43, H48, H66, H76, H80, H81 и H91 занято V, K, T, A, R, Q, I, R, A, D, L, Q и F соответственно, и по меньшей мере одно из положений L2, L12, L15, L37, L39, L45, L60 и L100 занято V, P, L, Q, R, R, D и Q соответственно.
3. Антитело по п.1, отличающееся тем, что переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 18, и переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 122.
4. Антитело по любому из пп.1-3, которое представляет собой химерное, венеризованное или гуманизированное антитело.
5. Антитело по любому из пп.1-3, которое представляет собой интактное антитело.
6. Антитело по любому из пп.1-4, которое представляет собой антиген-связывающий фрагмент.

7. Антитело по п.6, отличающееся тем, что антиген-связывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, Fab или Fab₂-фрагмент.

8. Антитело по п.6, отличающееся тем, что антиген-связывающий фрагмент представляет собой Fab-фрагмент или одноцепочечный Fv.

9. Антитело по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что изотип представляет собой IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека.

10. Антитело по любому из пп.1-5 и 9, содержащее легкую цепь, содержащую зрелую переменную область легкой цепи, слитую с константной областью легкой цепи, и тяжелую цепь, содержащую зрелую переменную область тяжелой цепи, слитую с константной областью тяжелой цепи.

11. Антитело по п.10, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области тяжелой цепи человека, которая имеет пониженное связывание с рецептором Fcγ по сравнению с природной константной областью тяжелой цепи человека.

12. Антитело по п.10, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи представляет собой изотип IgG1.

13. Антитело по п.12, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 176 с C-концевым лизином или без него.

14. Антитело по п.10, отличающееся тем, что зрелая переменная область тяжелой цепи, слитая с константной областью тяжелой цепи, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178 с C-концевым лизином или без него.

15. Антитело по п.10, дополнительно содержащее сигнальный пептид, слитый со зрелой переменной областью тяжелой и/или легкой цепи.

16. Антитело по п.14, отличающееся тем, что тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180 с C-концевым лизином или без него.

17. Антитело по п.10, отличающееся тем, что константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 177.

18. Антитело по п.10, отличающееся тем, что зрелая переменная область легкой цепи, слитая с константной областью легкой цепи, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 179.

19. Антитело по п.18, отличающееся тем, что легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181.

20. Антитело по п.14, отличающееся тем, что тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178 с C-концевым лизином или без него, и легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 179.

21. Антитело по п.16, отличающееся тем, что тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180 с C-концевым лизином или без него, и легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181.

22. Антитело по п.10, имеющее по меньшей мере одну мутацию в константной области тяжелой цепи.

23. Антитело по п.22, отличающееся тем, что указанная мутация снижает фиксацию или активацию комплемента константной областью тяжелой цепи.

24. Антитело по п.23, имеющее мутацию в одном или нескольких из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 или 331 согласно нумерации EU.

25. Антитело по п.24, содержащее аланин в положениях 318, 320 и 322.

26. Антитело по любому из пп.1-25, которое является по меньшей мере на 95% мас./мас. чистым.

27. Антитело по любому из пп.1-26, которое конъюгировано с терапевтическим, цитотоксическим, цитостатическим, нейротрофическим или нейропротекторным средством.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, как определено в любом из пп.1-27, и фармацевтически приемлемый носитель.

29. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и легкую цепь антитела, как описано в любом из пп.1-27.

30. Нуклеиновая кислота по п.29, отличающаяся тем, что тяжелая цепь кодируется последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 182, и легкая цепь кодируется последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 183.

31. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь антитела, как описано в любом из пп.1-27.

32. Нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь антитела, как описано в любом из пп.1-27.

33. Способ получения антитела, включающий:

(а) культивирование клеток, трансформированных нуклеиновой кислотой по п.29 или 30, таким образом, что клетки секретируют указанное антитело; и

(б) очистку антитела от среды культивирования клеток.

34. Способ получения клеточной линии, продуцирующей антитело, включающий:

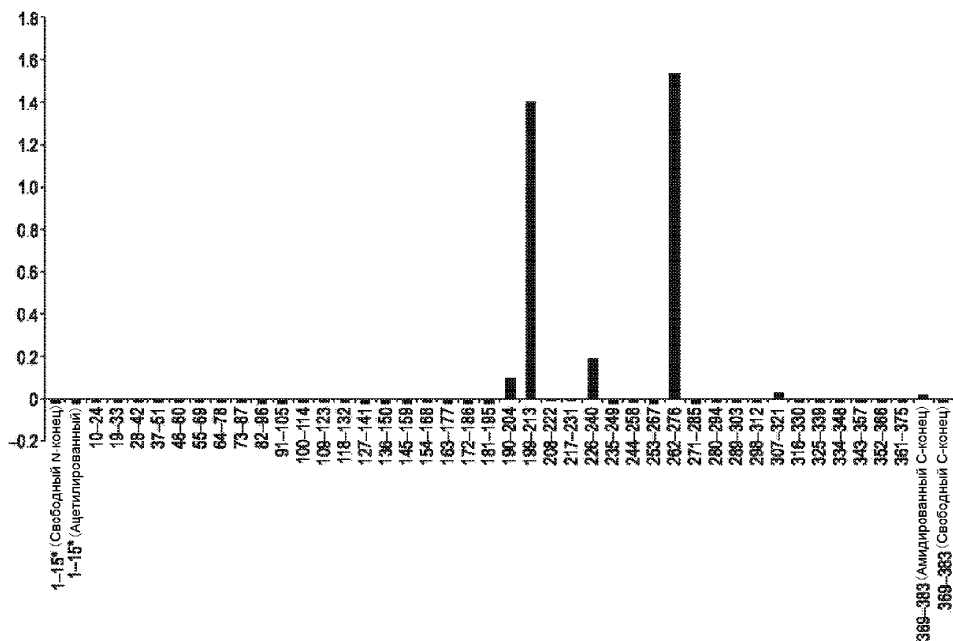
(а) введение вектора, содержащего нуклеиновую кислоту по п.29 или 30, и селективного маркера в клетки;

- (b) размножение клеток в условиях для отбора клеток с увеличенным числом копий вектора;
- (c) выделение отдельных клеток из выбранных клеток; и
- (d) создание банка клеток, клонированных из одной клетки, выбранной на основе выхода указанного антитела.

35. Применение антитела по любому из пп.1-27 для получения лекарственного средства для ингибирования или снижения агрегации тау-белка.

36. Применение антитела, определенного в любом из пп.1-27, для получения лекарственного средства для лечения или осуществления профилактики связанного с тау-белком заболевания.

37. Применение по п.36, отличающееся тем, что указанное связанное с тау-белком заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичную возрастную таупатию, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическую деменцию или деменцию боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь аргирофильных зерен, глобулярную глиальную таупатию, амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальную дегенерацию (КБД), деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), глобулярную глиальную таупатию (GGT) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).



Фиг. 1

	10	20	30	40	
3D6VH мыши	E V Q L Q Q S G A D L V R P G A L V K L S C K A S G F N I K D Y Y L H W V R Q R				40
IGHV1-69-2*01	E V Q L V Q S G A E V V K P P G A T V K I S C K V S G Y T F T D Y Y M H W V Q Q A				40
2RCS VH hFwK	Q V Q L Q Q S G A E L V K P P G A S V K L S C T A S G F N I K D Y Y L H W V K Q R				40
hu3D6 VHvb1	Q V Q L Q Q S G A E L V K P P G A S V K L S C T A S G F N I K D Y Y L H W V K Q R				40
hu3D6 VHvb2	E V Q L V Q S G A E V V K P P G A S V K I S C K A S G F N I K D Y Y L H W V R Q R				40
hu3D6 VHvb3	E V Q L V Q S G A E V V K P P G A T V K I S C K A S G F N I K D Y Y L H W V R Q R				40
hu3D6 VHvb4	E V Q L V Q S G A E V V K P P G A T V K I S C K A S G F T I K D Y Y L H W V R Q R				40
hu3D6 VHvb5	E V Q L V Q S G A E V V K P P G A T V K I S C K A S G F T I K D Y Y L H W V R Q R				40
hu3D6 VHvb6	E V Q L V Q S G A E V V K P P G A T V K I S C K A S G F T I K D Y Y L H W V R Q R				40
hu3D6 VHvb7	E V Q L V Q S G A E V V K P P G A T V K I S C K A S G F T I K D Y Y L H W V R Q R				40

	50	60	70	80	
3D6VH мыши	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T V Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y				80
IGHV1-69-2*01	P G K G L E W M G L V D P E D G E T I Y A E K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y				80
2RCS VH hFwK	P E Q G L E W I G R I D P A N G T K Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y				80
hu3D6 VHvb1	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T V Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y				80
hu3D6 VHvb2	P G K G L E W I G W I D P E N G D T V Y D P K F Q G R A T I T A D T S T D T A Y				80
hu3D6 VHvb3	P G K G L E W I G W I D P E N G D T I Y D P K F Q G R A T I T A D T S T D T A Y				80
hu3D6 VHvb4	P G K G L E W I G W I D P E N G D T I Y D P K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y				80
hu3D6 VHvb5	P G K G L E W I G W I D P E D G E T I Y D P K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y				80
hu3D6 VHvb6	P G K G L E W I G W I D P E D G E T V Y D P K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y				80
hu3D6 VHvb7	P G K G L E W I G W I D P E D G E T V Y D P K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y				80

	90	100	110	
3D6VH мыши	L Q L G S L T S E D T A V Y F C S T L D - - F W G Q G T T L T V S S			112
IGHV1-69-2*01	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A T - Q - - H W G Q G T L V T V S S			111
2RCS VH hFwK	L Q L S S L T S E D T A V Y Y C A S Y I G I Y W G Q G T L L I V S S			114
hu3D6 VHvb1	L Q L S S L T S E D T A V Y F C S T L D - - F W G Q G T T L T V S S			112
hu3D6 VHvb2	L E L S S L T S E D T A V Y F C S T L D - - F W G Q G T L V T V S S			112
hu3D6 VHvb3	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S T L D - - F W G Q G T L V T V S S			112
hu3D6 VHvb4	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S T L D - - F W G Q G T L V T V S S			112
hu3D6 VHvb5	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S T L D - - F W G Q G T L V T V S S			112
hu3D6 VHvb6	M E L S S L R S E D T A V Y F C S T L D - - F W G Q G T L V T V S S			112
hu3D6 VHvb7	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S T L D - - F W G Q G T L V T V S S			112

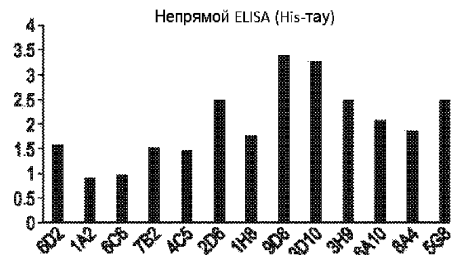
Фиг. 2

	10	20	30	40	
3D6VL мыши	D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
ARX71335_VL_hFwK	D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L Y S N G K T Y L N W				40
IGKV2-30*02	D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L V H S D G N T Y L N W				40
hu3D6VLvb1	D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu3D6VLvb2	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu3D6VLvb3	D V V M T Q S P L S L S V T L G E P A S I S C R S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40

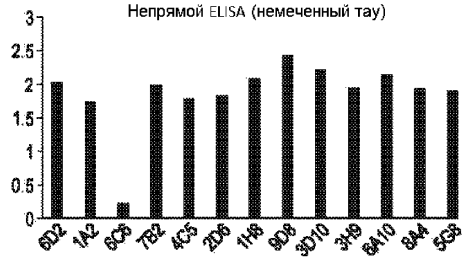
	50	60	70	80	
3D6VL мыши	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I				80
ARX71335_VL_hFwK	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
IGKV2-30*02	F Q Q R P G Q S P R R L I Y K V S N R D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu3D6VLvb1	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu3D6VLvb2	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu3D6VLvb3	L Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80

	90	100	110	
3D6VL мыши	S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K			112
ARX71335_VL_hFwK	S R V E A E D L G V H Y C E Q G T H F P L T F G A G T K L E L K			112
IGKV2-30*02	S R V E A E D V G V Y Y C M O G T H W P Y T F G Q G T K L E I K			112
hu3D6VLvb1	S R V E A E D L G V H Y C W Q G T H F P Y T F G A G T K L E L K			112
hu3D6VLvb2	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G A G T K L E I K			112
hu3D6VLvb3	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K			112

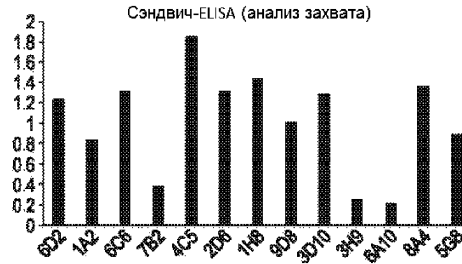
Фиг. 3



Фиг. 4А



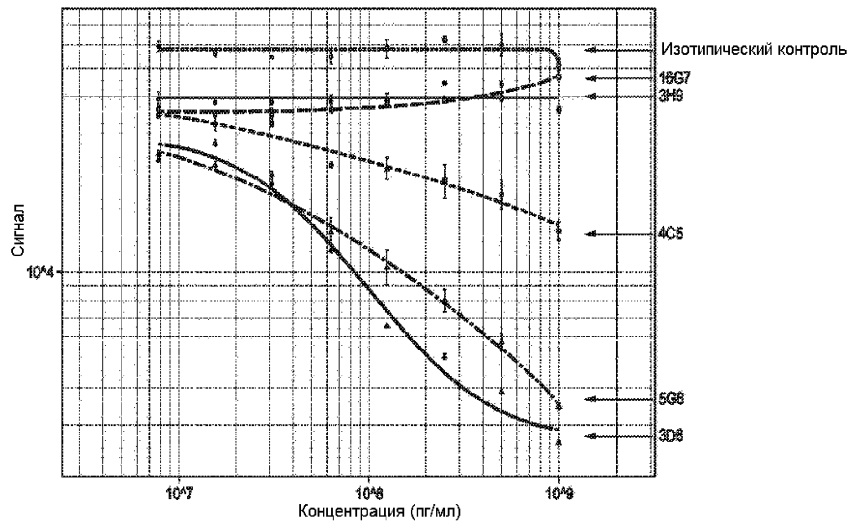
Фиг. 4В



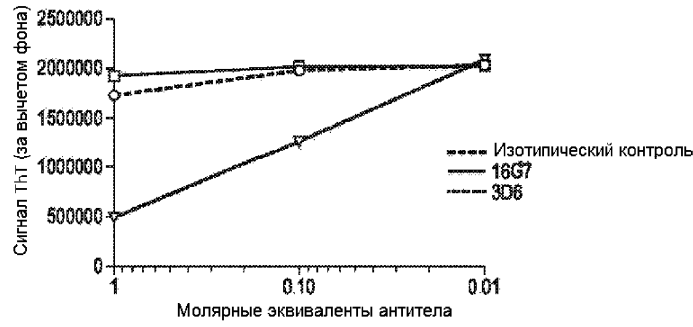
Фиг. 4С

Название	$k_B (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (нМ)$
3D6	2.68×10^6	1.19×10^{-3}	0.46
1H8	5.07×10^6	5.61×10^{-3}	11.1
3H9	4.71×10^6	1.41×10^{-3}	3.0
5G8	3.75×10^5	2.54×10^{-3}	6.78
6D2	3.83×10^5	3.18×10^{-3}	8.29
7G8	5.76×10^5	3.32×10^{-3}	5.77
8A4	5.99×10^5	2.27×10^{-3}	3.8

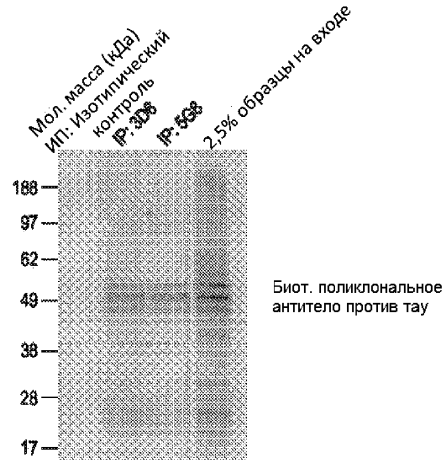
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

	10	20	30	40
3D6VH МЫШИ	E V Q L Q Q S G A D L V R P G A L V K L S C K A S G F N I K D Y Y L H W V R Q R			40
IGHV1-69-2*01 V E V K K T . . . I . . . V . . Y T F T . . . M . . . Q . . A			40
2RCS VH hFrwk	Q E . . K S T T . . M . . . K . . .			40
hu3D6 VHvb1	Q E . . K S T T . . M . . . K . . .			40
hu3D6 VHvb2 V E V K S I .			40
hu3D6 VHvb3 V E V K T . . . I .			40
hu3D6 VHvb4 V E V K T . . . I .			40
hu3D6 VHvb5 V E V K T . . . I .			40
hu3D6 VHvb6 V E V K T . . . I .			40
hu3D6 VHvb7 V E V K T . . . I .			40
hu3D6VHv1bA11 V E V K T . . . I .			40
h3D6 VHvb8 V E V K T . . . I .			40
h3D6 VHvb9 V E V K T . . . I .			40

	50	60	70	80
3D6VH МЫШИ	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T V Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y			80
IGHV1-69-2*01	. G K M . L V D . E . I . A E R V T D . . .			80
2RCS VH hFrwk R . . . A . . N . K .			80
hu3D6 VHvb1 R . . . A . . N . K .			80
hu3D6 VHvb2	. G K .			80
hu3D6 VHvb3	. G K .			80
hu3D6 VHvb4	. G K .			80
hu3D6 VHvb5	. G K .			80
hu3D6 VHvb6	. G K .			80
hu3D6 VHvb7	. G K .			80
hu3D6VHv1bA11	. G .			80
h3D6 VHvb8	. G .			80
h3D6 VHvb9	. G .			80

Фиг. 9А

	90	100	110	
3D6VH МЫШИ	L Q L G S L T S E D T A V Y F C S T L D	- - F W G Q G T T L T V S S		
IGHV1-69-2*01	M E . S . . R Y . A . - Q - - H	L V		112
2RCS VH hF _{rwk}	. . . S Y . A S Y Y G I Y			111
hu3D6 VHvb1	. . . S			114
hu3D6 VHvb2	. E . S	- -	L V	112
hu3D6 VHvb3	M E . S . . R Y	- -	L V	112
hu3D6 VHvb4	M E . S . . R Y	- -	L V	112
hu3D6 VHvb5	M E . S . . R Y	- -	L V	112
hu3D6 VHvb6	M E . S . . R	- -	L V	112
hu3D6 VHvb7	M E . S . . R Y	- -	L V	112
hu3D6VHv1bA11	- -	L V	112
h3D6 VHvb8	- -	L V	112
h3D6 VHvb9	M E . . . V R	- -	L V	112

Фиг. 9B

	10	20	30	
hu3D6VLv2	D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L			30
hu3D6VLv2 L37Q			30
hu3D6VLv2 L50G			30
hu3D6VLv2 S52G			30
hu3D6VLv2 L54G			30
hu3D6VLv2 L54D			30
hu3D6VLv2 L54K			30
hu3D6VLv2 L54R			30
hu3D6VLv2 L54T			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50G			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50D			30
hu3D6VLv2 L37Q_S52G			30
hu3D6VLv2 L37Q_L54G			30
hu3D6VLv2 L37Q_L54R			30
hu3D6VLv2 L37Q_L54T			30
hu3D6VLv2 L37Q_L54D			30
hu3D6VLv2 L37Q_L54E			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G			30
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D			30
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G			30
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T			30
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q			30
hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q			30
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q			30
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q			30

Фиг. 10A

	40	50	60
hu3D6VLv2	D	S	D
hu3D6VLv2 L37Q	G	K	T
hu3D6VLv2 L50G	Y	L	N
hu3D6VLv2 S52G	W	L	L
hu3D6VLv2 L54G	Q	R	P
hu3D6VLv2 L54D	G	Q	S
hu3D6VLv2 L54K	P	R	R
hu3D6VLv2 L54R	L	I	I
hu3D6VLv2 L54T	Y	L	V
hu3D6VLv2 L37Q_L50G	S	K	L
hu3D6VLv2 L37Q_L50D	D		
hu3D6VLv2 L37Q_S52G			
hu3D6VLv2 L37Q_L54G			
hu3D6VLv2 L37Q_L54R			
hu3D6VLv2 L37Q_L54T			
hu3D6VLv2 L37Q_L54D			
hu3D6VLv2 L37Q_L54E			
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R			
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G			
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R			
hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R			
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R			
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q			

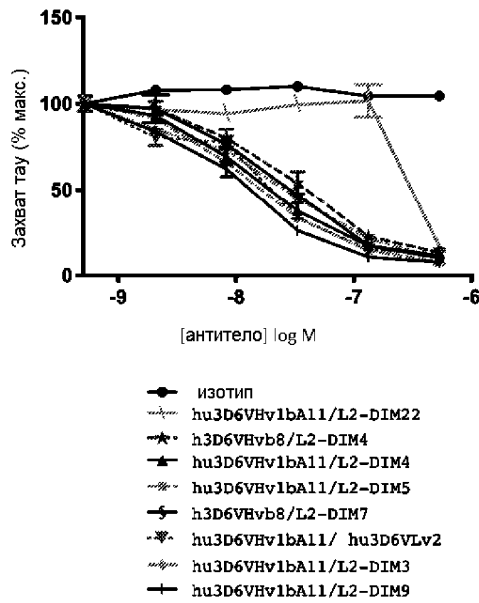
Фиг. 10B

	70	80	90
hu3D6VLv2	S	G	V
hu3D6VLv2 L37Q	P	D	R
hu3D6VLv2 L50G	F	S	G
hu3D6VLv2 S52G	S	G	S
hu3D6VLv2 L54G	G	S	G
hu3D6VLv2 L54D	T	D	F
hu3D6VLv2 L54K	I	L	K
hu3D6VLv2 L54R	I	S	R
hu3D6VLv2 L54T	V	E	A
hu3D6VLv2 L37Q_L50G	E	D	V
hu3D6VLv2 L37Q_L50D	G	V	
hu3D6VLv2 L37Q_S52G			
hu3D6VLv2 L37Q_L54G			
hu3D6VLv2 L37Q_L54R			
hu3D6VLv2 L37Q_L54T			
hu3D6VLv2 L37Q_L54D			
hu3D6VLv2 L37Q_L54E			
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R			
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G			
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R			
hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R			
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R			
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q			
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q			

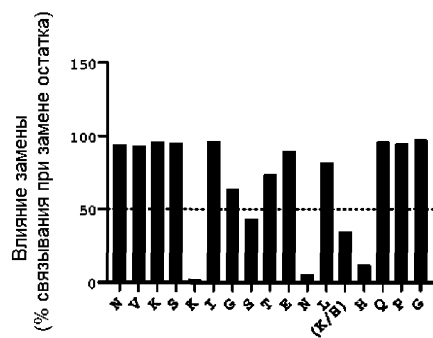
Фиг. 10C

	100	110	
hu3D6VLv2	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q	C	C	112
hu3D6VLv2 L50G	W	W	112
hu3D6VLv2 S52G	Q	Q	112
hu3D6VLv2 L54G	G	G	112
hu3D6VLv2 L54D	T	T	112
hu3D6VLv2 L54K	H	H	112
hu3D6VLv2 L54R	F	F	112
hu3D6VLv2 L54T	P	P	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50G	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50D	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_S52G	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L54G	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L54R	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L54T	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L54D	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L54E	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R	Y	Y	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q	Y	Q	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q	Y	Q	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q	Y	Q	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q	Y	Q	112
hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q	Y	Q	112
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q	Y	Q	112
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q	Y	Q	112

Фиг. 10D



Фиг. 11



Фиг. 12A

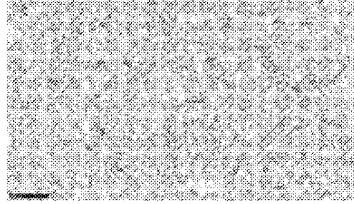
Повтор 1 области связывания микротрубочек (aa 255-271) N V K S **K I G S T E N** L ^Λ K H Q P G
 Повтор 2 области связывания микротрубочек (aa 286-302) N V Q S **K C G S K D N** I K H V P G
 Повтор 3 области связывания микротрубочек (aa 317-333) K V T S **K C G S I G N** I H H K P G
 Повтор 4 области связывания микротрубочек (aa 349-365) R V Q S **K I G S I D N** I T H V P G

Важные остатки для связывания 3D6

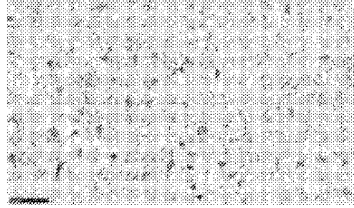
^Λ Важный остаток, не изменяемый в повторе 4

Фиг. 12В

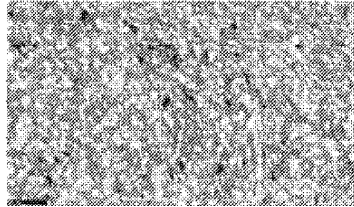
Нормальный здоровый контроль
1 мкг/мл



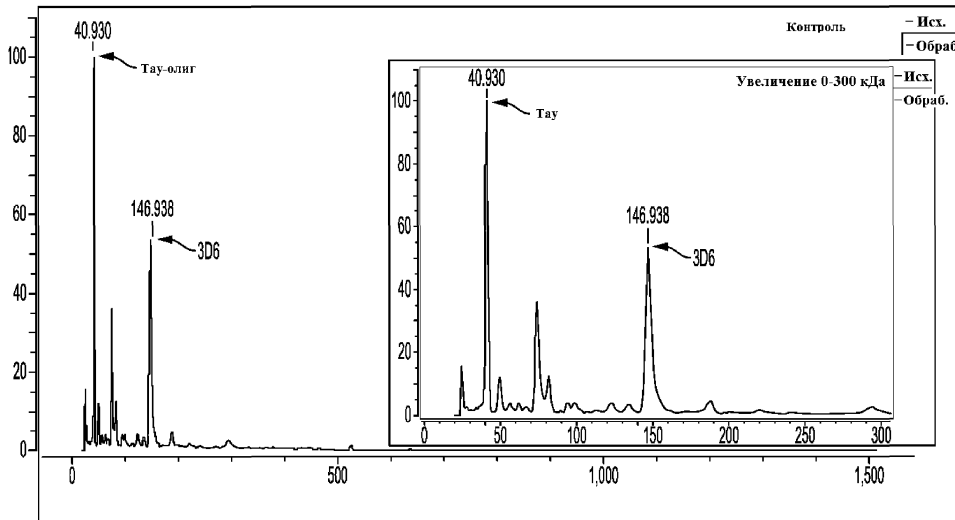
Болезнь Альцгеймера
0,1 мкг/мл



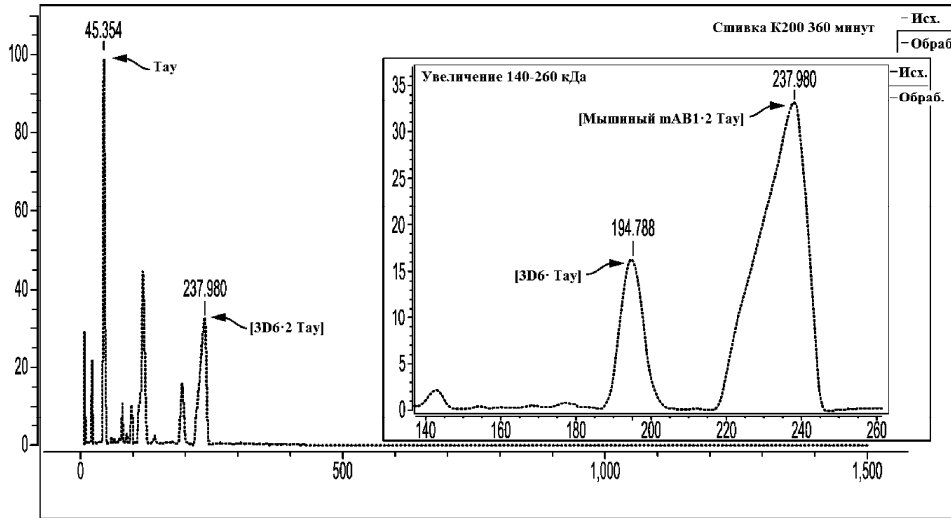
Болезнь Альцгеймера
1 мкг/мл



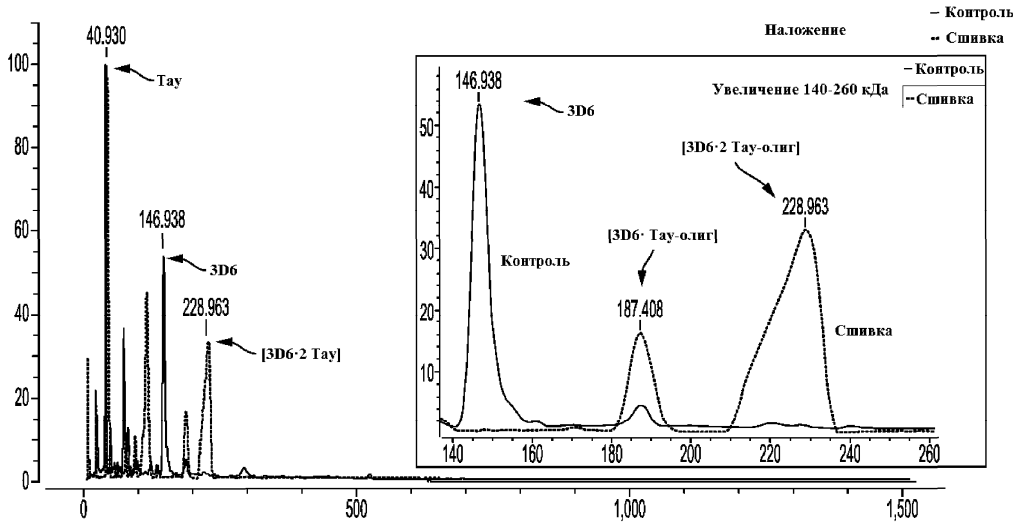
Фиг. 13



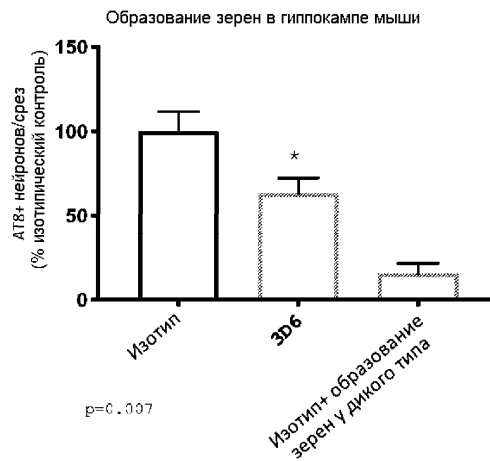
Фиг. 14А



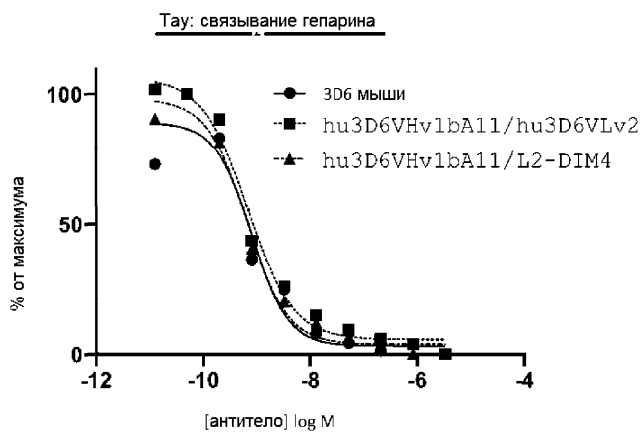
Фиг. 14В



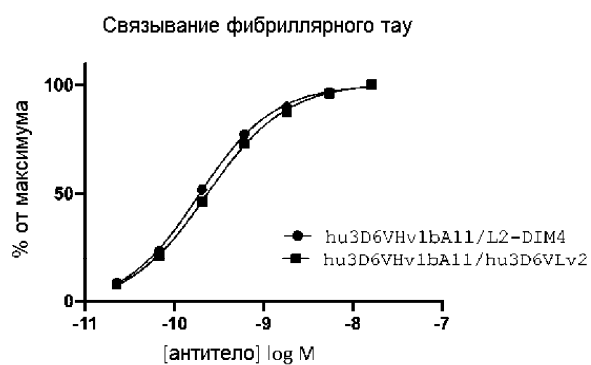
Фиг. 14С



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

