

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047896**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.26

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)

(21) Номер заявки
202191306

(22) Дата подачи заявки
2019.11.08

(54) **АНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ ТАУ**

(31) **PCT/US2018/059895; 62/758,421**

(56) **WO-A1-2017191560**

(32) **2018.11.08; 2018.11.09**

(33) **US**

(43) **2021.08.23**

(86) **PCT/US2019/060616**

(87) **WO 2020/097561 2020.05.14**

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

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

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

(57) В настоящем изобретении предложены антитела, которые специфично связываются с тау. Антитела ингибируют или отсрочивают связанные с тау патологии и связанные ухудшения симптомов.

047896
B1

047896
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании заявки на патент США № 62/758421, поданной 9 ноября 2018 года, и заявки PCT/US 2018/059895, поданной 8 ноября 2018 года, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящее изобретение включает электронный перечень последовательностей, записанный в файле с названием 2019-11-08 536322WO_ST25.TXT, созданном 08 ноября 2018 года, составляющем 96408 байт, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки для любых 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 антитело, специфически 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, и положение H58 занято V или I, и зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR L1, L2 и L3, содержащую SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно, за исключением того, что положение L24 может быть занято K или R, 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, L10 занято T, L17 занято на E, L24 занято R, L37 занято Q, L83 занято L, L86 занято H, L100 занято A или Q, L106 занято L.

В некоторых таких антителах CDR-H1 содержит SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 86, CDR-H2 содержит SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 92, CDR-H3 содержит SEQ ID NO: 10, CDR-L1 содержит SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 89, CDR-L2 содержит SEQ ID NO: 13 и CDR-L3 содержит SEQ ID NO: 14. В некоторых таких антителах CDR-H1 содержит SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 86, CDR-H2 содержит SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 88, CDR-H3 содержит SEQ ID NO: 10, CDR-L1 содержит SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 89, CDR-L2 содержит SEQ ID NO: 13, и CDR-L3 содержит SEQ ID NO: 14. В некоторых таких антителах CDR-H1 содержит SEQ ID NO: 86, CDR-H2 содержит SEQ ID NO: 92, CDR-H3 содержит SEQ ID NO: 10, CDR-L1 содержит SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 89, CDR-L2 содержит SEQ ID NO: 13, и CDR-L3 содержит SEQ ID NO: 14.

В некоторых таких антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86. В некоторых таких антителах CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87. В некоторых таких антителах CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 88. В некоторых таких антителах CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 92. В некоторых таких антителах CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 89.

В некоторых таких антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86, и CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87. В некоторых таких антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86, и CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 88. В некоторых таких антителах CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86,

и CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 92.

В некоторых таких антителах антитело представляет собой гуманизированное антитело, венированное антитело или химерное антитело.

В некоторых антителах гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 76-80 и SEQ ID NO: 90-91, и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 83-85. В некоторых антителах гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 76-80, и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 83-85. В некоторых антителах гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 90-91, и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 83-85.

В некоторых таких антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H93 занимает S и H94 занимает T. В некоторых таких антителах положения H93 и H94 занимают S и T, соответственно.

В некоторых таких антителах положение H91 в области VH занимает F.

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

В некоторых таких антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H17 занимает T, H80 занимает M, H83 занимает R. В некоторых антителах положения H17, H80 и H83 в области VH занимают T, M и R, соответственно.

В некоторых таких антителах положение H58 в области VH занимает I.

В некоторых таких антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H28 занимает T, H67 занимает V. В некоторых антителах положения H28 и H67 в области VH занимают T и V соответственно.

В некоторых таких антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H54 занимает D, H56 занимает E. В некоторых антителах положения H54 и H56 в области VH занимают D и E соответственно.

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

В некоторых антителах положения H91, H93 и H94 в области VH занимают F, S и T, соответственно. В некоторых антителах положения H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H75, H76, H81, H91, H93, H94, H108 и H109 в области VH занимают E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, F, S, T, L и V, соответственно. В некоторых 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 занимают 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 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 занимают 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 H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH занимают 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 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 занимают 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 таких антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L7 занимает S, L10 занимает S, L15 занимает L, L83 занимает V, L86 занимает Y и L106 занимает I. В некоторых антителах положения L7, L10, L15, L83, L86 и L106 занимают S, S, L, V, Y и Y соответственно.

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

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

Антитело может представлять собой интактное антитело мыши, химерное, венированное или гуманизированное антитело или связывающий фрагмент, одноцепочечный Fab-фрагмент антитела, Fab'-фрагмент или одноцепочечный Fv. Некоторые из антител относятся к изотипу IgG1 человека, тогда как другие могут относиться к изотипу IgG2 или IgG4 человека. Некоторые антитела содержат зрелую вариабельную область легкой цепи, слитую с константной областью легкой цепи, и зрелую вариабельную область тяжелой цепи, слитую с константной областью тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи некоторых антител представляет собой мутантную форму природной константной области тяжелой цепи человека, которая характеризуется пониженным связыванием с рецептором Fc γ по сравнению с природной константной областью тяжелой цепи человека. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 103, содержащую или не содержащую C-концевой лизин, и/или зрелая вариабельная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 104.

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.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая любое из антител, раскрытых в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и/или легкую цепь любого из антител, раскрытых в настоящем документе, рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, и клетка-хозяин, трансформированная рекомбинантным вектором экспрессии. Например, нуклеиновая кислота может иметь последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 30-31, 93-99, 100-102 и 105-106. В другом примере нуклеиновая кислота может иметь последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 30-31, 93-97, 100-102 и 105-106. В другом примере нуклеиновая кислота может иметь последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 30-31, 98-99, 100-102 и 105-106.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую зрелую вариабельную область тяжелой цепи и зрелую вариабельную область легкой цепи, функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, для осуществления экспрессии в клетке млекопитающего любого из описанных в настоящем документе антител, при этом клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, и способ экспрессии антитела в клетке млекопитающего включает включение нуклеиновой кислоты в геном трансгенного животного, посредством чего экспрессируется антитело.

Некоторые векторы содержат нуклеиновую кислоту, дополнительно кодирующую константную область тяжелой цепи, слитую со зрелой вариабельной областью тяжелой цепи, и константную область легкой цепи, слитую с вариабельной областью зрелой легкой цепи. В некоторых векторах кодируемая константная область тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 103 с C-концевым лизином или без него, а кодируемая константная область легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 104. В некоторых векторах константная область тяжелой цепи кодируется последовательностью SEQ ID NO: 105, а константная область легкой цепи кодируется последовательностью SEQ ID NO: 106.

В некоторых векторах экспрессируемое антитело, кодируемое нуклеиновой кислотой, представляет собой scFv. В некоторых векторах экспрессируемое антитело, кодируемое нуклеиновой кислотой, представляет собой 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 вариабельными областями тяжелой и легкой цепей. В некоторых векторах нуклеиновая кислота оптимизирована по кодонам 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 первый и второй векторы, соответственно содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие зрелую вариабельную область тяжелой цепи и зрелую вариабельную область легкой цепи, каждая из которых функционально связана с одной или более регу-

ляторными последовательностями для осуществления экспрессии в клетке млекопитающего любого из описанных в настоящем документе антител, при этом клетка-хозяин содержит нуклеиновые кислоты, и способ экспрессии антитела в клетке млекопитающего включает введение нуклеиновых кислот в геном трансгенного животного, посредством чего антитело экспрессируется.

В некоторых векторах нуклеиновые кислоты, соответственно, дополнительно кодируют константную область тяжелой цепи, слитую со зрелой вариабельной областью тяжелой цепи, и константную область легкой цепи, слитую с зрелой вариабельной областью легкой цепи. В некоторых векторах кодируемая константная область тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 103 с С-концевым лизином или без него, и кодируемая константная область легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 104. В некоторых векторах константная область тяжелой цепи кодируется последовательностью SEQ ID NO: 105, и константная область легкой цепи кодируется последовательностью SEQ ID NO: 106.

Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы гуманизации любого антитела, отличного от антитела человека, описанного в настоящем документе, например, антитела 3D6 мыши, причем 3D6 характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 11. Такие способы могут включать в себя отбор одного или нескольких акцепторных антител, синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши, и экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизованного антитела.

Также предложены способы получения антител, таких как гуманизованное, химерное или венированное антитело, например, гуманизованная, химерная или венированная формы 3D6. В таких способах клетки, трансформированные нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела, культивируют так, чтобы клетки секретировали антитело. Затем антитело можно очистить из среды для культуры клеток.

Линии клеток, продуцирующие любое из антител, раскрытых в настоящем документе, можно получить посредством введения в клетки вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи антитела, и селективного 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 $100 \text{ мг/л}/10^6$ 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. Иллюстративные линии клеток представляют собой линии клеток, экспрессирующие 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 в себя введение субъекту эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого ингибирование или снижение агрегации тау у субъекта. Иллюстративные антитела включают гуманизованные версии 3D6.

Также предложены способы лечения или осуществления профилактики вызванного тау заболевания у субъекта, причем указанные способы включают в себя 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 в себя введение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого снижение передачи тау.

Также предложены способы индукции фагоцитоза тау, причем указанные способы включают в себя 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 в себя 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 в себя 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 в себя 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 внутрочерепной 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 в себя 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 в себя 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.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 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 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 и hu3D6VHvb7 представляет собой SEQ ID NO: 91. CDR, определенные согласно сводному определению Кэбота/Чотиа, выделены жирным шрифтом.

На фиг. 2 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. 3А, 3В и 3С показаны результаты скрининговых анализов ELISA для выбранных мышинных моноклональных антител против тау.

На фиг. 4 представлена кинетика связывания отобранных моноклональных антител мыши против тау с рекомбинантным тау человека.

На фиг. 5 представлены результаты функциональных блокирующих анализов отобранных моноклональных антител мыши против тау.

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

На фиг. 7 представлены результаты экспериментов, демонстрирующие, что 3D6 и 5G8 иммунным способом захватывают тау из ткани, пораженной болезнью Альцгеймера человека.

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 вариабельной 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 вариабельной 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 вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv1.

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

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

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

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

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

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

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

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

В SEQ ID NO: 24 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи акцептора с учетн. № ВАС01986.1.

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. № ААЗ09048.1.

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 гуманизированного 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 гуманизированного 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 гуманизированных антител 3D6 (VHv1, VHv2, VHv1b, VHv1bA11 и VHv5) (отмечена "Большинство" на фиг. 2 в PCT/IB 2017/052544).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В SEQ ID NO: 54 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHv3c.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В SEQ ID NO: 65 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H3 гуманизированного 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 гуманизированных 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 гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb1.

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

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

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

В SEQ ID NO: 80 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного 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: 82 представлена аминокислотная последовательность вариабельного акцептора легкой цепи с учетн. № ARX71335-VL_huFrwk.

В SEQ ID NO: 83 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLvb1.

В SEQ ID NO: 84 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLvb2.

В SEQ ID NO: 85 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLvb3.

В SEQ ID NO: 86 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 альтернативного гуманизированного антитела 3D6 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (как в hu3D6VHvb4 и

hu3D6VHvb5).

В SEQ ID NO: 87 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 альтернативного гуманизированного антитела 3D6 согласно Кэботу (как в hu3D6VHvb3 и hu3D6VHvb4).

В SEQ ID NO: 88 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 альтернативного гуманизированного антитела 3D6 согласно Кэботу (как в hu3D6VHvb5).

В SEQ ID NO: 89 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 альтернативного гуманизированного антитела 3D6 согласно Кэботу (как в hu3D6VLvb3).

В SEQ ID NO: 90 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb6.

В SEQ ID NO: 91 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb7.

В SEQ ID NO: 92 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 альтернативного гуманизированного антитела 3D6 согласно Кэботу (как в hu3D6VHvb6 и hu3D6VHvb7).

В SEQ ID NO: 93 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb1.

В SEQ ID NO: 94 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb2.

В SEQ ID NO: 95 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb3.

В SEQ ID NO: 96 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb4.

В SEQ ID NO: 97 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb5.

В SEQ ID NO: 98 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb6.

В SEQ ID NO: 99 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb7.

В SEQ ID NO: 100 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLvb1.

В SEQ ID NO: 101 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLvb2.

В SEQ ID NO: 102 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLvb3.

В SEQ ID NO: 103 представлена аминокислотная последовательность примера IgG1 константной области тяжелой цепи.

В SEQ ID NO: 104 представлена аминокислотная последовательность примера константной области легкой цепи каппа.

В SEQ ID NO: 105 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пример IgG1 константной области тяжелой цепи.

В SEQ ID NO: 106 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пример константной области легкой цепи каппа.

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 авидность, составляющую по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , или 10^{12} M^{-1} . Специфичное связывание является обнаруживаемым 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 ван-дерваальсовых 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" (прибли-

зительно 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 домен легкой цепи" ("домен VL") или "переменной домен 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 специфического 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 изобретении описана последовательность VL с R в качестве C-концевого остатка, R альтернативно можно рассматривать как N-концевой остаток константной области легкой цепи. Таким образом, настоящее изобретение 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. Общеизвестные 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)₂, 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), лептинный 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).

Иллюстративные биспецифичные антитела могут также представлять собой: (1) антитело с двойным варибельным доменом (dual-variable-domain antibody, DVD-Ig), в котором каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два варибельных 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 докинга" в протеинкиназе A, которая при применении с Fab позволяет получить тривалентный биспецифичный связывающий белок, состоящий из двух идентичных Fab-фрагментов, присое-

диненных 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 несколько 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, который, 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 несколько 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.

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 эпитопами в области связывания микротрубочек (MTBR) тау человека. 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)

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

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

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

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

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEEAGI	GDTPSLEDEA
70	80	90	100	110	120
AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKGQANA	TRIPAKTPPA
130	140	150	160	170	180
PKTPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV	VRTPPKSPSS
190	200	210	220	230	240
AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQII	NKKLDLSNVQ	SKCGSKDNIK
250	260	270	280	290	300
HVPGGGSVQI	VYKPVDSLKV	TSKCGSLGNI	HHKPGGGQVE	VKSEKLDKFD	RVQSKIGSLD
310	320	330	340	350	360
NITHVPGGGN	KKIETHKLTF	RENAKAKTDH	GAEIVYKSPV	VSGDTSRHL	SNVSSTGSID
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	DEGAPGQAA	AQPHTEIPG	TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG
130	140	150	160	170	180
HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK
190	200	210	220	230	240
TPPSSGEPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSR	RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR	TTPPKSPSSAK
250	260	270	280	290	300
SRLQTAPVPM	PDLKNVSKI	GSTENLKHQP	GGGKVQIVYK	PVDLSKVTSK	CGSLGNIHKK
310	320	330	340	350	360
PGGGQVEVKS	EKLDFKDRVQ	SKIGSLDNIT	HVPGGGNKKI	ETHKLTFREN	AKAKTDHGAE
370	380	390	400	410	
IVYKSPVVSG	DTSRHLNSV	SSTGSIDMVD	SPQLATLADE	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	TAEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMVS	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT
130	140	150	160	170	180
KIATPRGAAP	PGQKGQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
190	200	210	220	230	240
SRTPSLPTFP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVSK	IGSTENLKHQ
250	260	270	280	290	300
PGGGKVQIVY	KPVDLSKVT	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDKDRV	QSKIGSLDNI
310	320	330	340	350	360
THVPGGGNKK	IETHKLTFR	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN	VSSTGSIDMV
370	380				
DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L			

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEEAGI	GDTPSLEDEA
70	80	90	100	110	120
AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKGQANA	TRIPAKTPPA
130	140	150	160	170	180
PKTPPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV	VRTPPKSPSS
190	200	210	220	230	240
AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQIV	YKPVDLSKVT	SKCGSLGNIH
250	260	270	280	290	300
HKPGGGQVEV	KSEKLDKDR	VQSKIGSLDN	ITHVPGGGNK	KIETHKLTFR	ENAKAKTDHG
310	320	330	340	350	
AEIVYKSPVV	SGDTSPRHLS	NVSSTGSIDM	VDSPQLATLA	DEVSASLAKQ	GL

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 эпитопами в области связывания микротрубочек (MTBR) тау человека. 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 несколько остатков, поддающихся 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.

Если из контекста не очевидно обратное, упоминание о 3D6 следует понимать как упоминание о любой из формы мыши, химерной, венированной и гуманизированной формы данного антитела. Антитело было депонировано как [НОМЕР ДЕПОНИРОВАНИЯ]. Данное антитело специфично связывается с областью MTBR в SEQ ID NO: 1). 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, представляет собой другое такое иллюстративное антитело 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.

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 иллюстративного антитела, такого как 3D6. Моноклональные антитела, которые по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны 3D6 или любое другое примерное антитело или цепь антитела по аминокислотной последовательности зрелых переменных 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 переменную область тяжелой цепи, которая содержит по меньшей мере два, но обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из переменной области тяжелой цепи 3D6, и/или переменную область легкой цепи, которая содержит по меньшей мере два, но обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из переменной 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 переменных 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 фор-

мами тау или иными формами. Аналогично, некоторые антитела являются иммунологически реактивными в отношении непатологической и патологической формы и конформаций тау.

В. Гуманизированные антитела.

Гуманизированное антитело представляет собой генноинженерное антитело, в котором CDR от "донорного" антитела, отличного от антитела человека, переносят в "акцепторные" последовательности антитела человека (см., например, публикации Queen, US 5,530,101 и 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; и Foote, US 6,881,557). 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 варибельной области и константные области, в случае присутствия, полученные полностью или по существу из последовательности 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 варибельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, в случае присутствия, полученные по существу из последовательностей каркасного участка варибельной 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 варибельной области легкой цепи и константную область легкой цепи, в случае присутствия, полученные по существу из последовательностей каркасного участка варибельной 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 варибельной области цепи антитела или константная область цепи антитела получены по существу из последовательности каркасного участка варибельной 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 гуманизированного в соответствии с определением гуманизированных 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 варибельной 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 "гуманизированное" в настоящем документе не ограничен определением гуманизированных антител согласно МНН ВОЗ 2014 г. Некоторые из гуманизированных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности по меньшей мере 85% последовательностям зародышевой линии человека, и некоторые из гуманизированных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности менее 85% последовательностям зародышевой линии человека. Некоторые из тяжелых цепей гуманизированных 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 гуманизированных 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 гуманизированные 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 гуманизированные 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 по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека. Дополнительные гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению соответствуют определению "смешанных" антител согласно МНН ВОЗ 2014 г.

Несмотря на то, что гуманизированные 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 гуманизированном 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 гуманизированных антителах в положениях, в которых отсутствуют один или несколько 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 гуманизированном антителе и, как следствие, снижения потенциальной иммуногенности, и/или для соответствия определению "гуманизированного" 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.

Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи представляет собой зрелую вариабельную область тяжелой цепи человека гуманизированного 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. Другим 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. Другим 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 гуманизированных переменных областях легкой цепи и тяжелой цепи, могут быть взяты из любой из используемых последовательностей акцепторного антитела человека. Например, зрелые переменные 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 переменной области тяжелой цепи 3D6. Пример положений, в которых данные два акцептора отличаются, включает положение H17 (T или S). Гуманизированные версии переменной области тяжелой цепи 3D6 могут содержать любые аминокислоты в данном положении. Например, зрелые переменные 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 переменной области легкой цепи 3D6. Примером положения, в котором эти два акцептора различаются, является положение L100 (Q или A). Гуманизированные версии переменной области легкой цепи 3D6 могут включать любую аминокислоту в этом положении.

Определенные аминокислоты из каркасных остатков переменной 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 переменной области мыши и выбранным каркасным остатком переменной 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.

В настоящем изобретении предложены гуманизированные формы антитела 3D6 мыши, включая 7 иллюстративных гуманизированных зрелых переменных 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) и hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO: 91)) и 3 иллюстративных гуманизированных зрелых переменных области легкой цепи (hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO: 83), hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO: 84) и hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO: 85)).

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 5,530,101 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 переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые содержат SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11, соответственно. В настоящем изобретении предложены 7 иллюстративных гуманизированных зрелых переменных областей тяжелой цепи: hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6 и hu3D6VHvb7. В настоящем изобретении дополнительно предложены 3 иллюстративных зрелых переменных области легкой цепи hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2 и hu3D6VLvb3. На фиг. 1 и 2 показано выравнивание переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, соответственно, мышинового 3D6 и различных гуманизированных 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 31 каркасных положений переменной области посчитали кандидатами для замен в 3 иллюстративных зрелых переменных областях легкой цепи человека и 7 иллюстративных зрелых переменных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примерах: L7 (T7S, из зародышевой линии), L10 (T10S, из зародышевой линии), L15 (I15L, из зародышевой линии), L17 (Q17E, для увеличения стабильности), L37 (L37Q, из зародышевой линии), L45 (K45R, из зародышевой линии), L83 (L83V, из зародышевой линии), L86 (H86Y, из мышинового 3D6), L100 (A100Q, из зародышевой линии), L106 (L106I, из зародышевой линии), H1 (Q1E, из мышинового 3D6), H5 (Q5V, из зародышевой линии), H11 (L11V, из зародышевой линии), H17 (S17T, из зародышевой линии), H20 (L20I, из зародышевой линии), H23 (T23K, из зародышевой линии), H38 (K38R, из мышинового 3D6), H42 (E42G, из зародышевой линии), H43 (Q43K, из зародышевой линии), H66 (K66R, из зародышевой линии), H67 (A67V, из зародышевой линии), H75 (S75T, из зародышевой линии), H76 (N76D, из зародышевой линии), H80 (L80M, из зародышевой линии), H81 (Q81E, из зародышевой линии), H83 (T83R, из зародышевой линии), H91 (Y91F, из мышинового 3D6), H93 (A93S, из мышинового 3D6), H94 (S94T, из мышинового 3D6), H108 (T108L, из зародышевой линии) и H109 (L109V, из зародышевой линии). Здесь и в других местах при описании замен комментарии в скобках указывают на одно обоснование замены. Некоторые замены имеют несколько обоснований. Следующие 5 положений CDR переменной области были рассмотрены в качестве кандидатов на замену в 3 иллюстративных зрелых переменных областях легкой цепи человека и в 7 иллюстративных примерах зрелой переменной области тяжелой цепи человека, как дополнительно указано в примерах: L24 (K24R, из зародышевой линии), H28 (N28T, из зародышевой линии), H54 (N54D, из зародышевой линии), H56 (D56E, из зародышевой линии) и H58 (V58I, из зародышевой линии). В некоторых гуманизированных 3D6 антителах, 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: 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.

Здесь, как и в другом месте, упомянутый первым остаток представляет собой остаток гуманизированного 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 переменной 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 переменных 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 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) и hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO: 91), с любой из гуманизированных переменных областей легкой цепи 3D6VLhu3D6VLv1 (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 вариабельных областей легкой цепи hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO: 83), hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO: 84), или hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO: 85), с любой из гуманизированных вариабельных областей тяжелой цепи 3D6V6 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 предложены варианты гуманизованного антитела 3D6, в которых гуманизованная зрелая вариабельная 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), hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO: 80), hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO: 90), или hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO: 91), и гуманизованная зрелая вариабельная 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), или hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO: 85). 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 или все 36 из обратных мутаций или других мутаций в SEQ ID NO: 76-80, SEQ ID NO: 90-91 и SEQ ID NO: 83-85). Некоторые такие гуманизированные антитела содержат одинаковый набор обратных мутаций или других мутаций, как в иллюстративных последовательностях, определяющих идентичность последовательностей.

Тем самым, например, настоящее изобретение включает гуманизированные антитела, имеющие зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющие по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности со зрелой вариабельной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 77 и одинаковый набор мутаций, перечисленный в таблице 6 для SEQ ID NO: 77, и три CDR из SEQ ID NO: 77 и область зрелой легкой цепи с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 84 или 85 и тем же набором мутации, перечисленным в таблице 7 для SEQ ID NO: 84 или 85 соответственно и трех CDR SEQ ID NO: 84 или 85 соответственно. Некоторые антитела содержат зрелую тяжелую вариабельную область цепи SEQ ID NO: 77 и зрелую вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 84 или 85.

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, имеющие зрелую вариабельную область тяжелой цепи с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с зрелой вариабельной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 90, и тот же набор мутаций, который указан в таблице 6 для SEQ ID NO: 90, и три CDR из SEQ ID NO: 90, и область зрелой легкой цепи с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 84 или 85, и тот же набор мутаций, который перечислен в таблице 7 для SEQ ID NO: 84 или 85 соответственно и трех CDR из SEQ ID NO: 84 или 85 соответственно. Некоторые антитела содержат зрелую вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 90 и зрелую вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 84 или 85.

В некоторых гуманизированных антителах 3D6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H93 занимает S, и H94 занимает T. В некоторых гуманизированных антителах 3D6 положения H93 и H94 (Верньерные остатки) занимают S и T, соответственно, как в случае, например, с huVHvb1, huVHvb2, huVHvb3, huVHvb4, huVHvb5, huVHvb6 и huVHvb7.

В некоторых гуманизированных антителах 3D6 положение H91 (остаток поверхности взаимодействия) в области VH занимает F, как в случае, например, с huVHvb1, huVHvb2 и huVHvb6.

В некоторых гуманизированных антителах 3D6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H5 занимает V, H11 занимает V, H20 занимает I, H23 занимает K, H38 занимает R, H42 занимает G, H43 занимает K, H66 занимает R, H75 занимает T, H76 занимает D, H81 занимает E, H108 занимает L, H109 занимает V. В некоторых гуманизированных антителах 3D6 положения H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H75, H76, H81, H108 и H109 в области VH занимают E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, L и V, соответственно, как, например, в huVHvb2, huVHvb3, huVHvb4, huVHvb5, huVHvb6 и huVHvb7.

В некоторых гуманизированных антителах 3D6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H17 занимает T, H80 занимает M, H83 занимает R. В некоторых гуманизированных антителах 3D6 положения H17, H80 и H83 в области VH занимают T, M и R, соответственно, как, например, в huVHvb3, huVHvb4, huVHvb5, huVHvb6 и huVHvb7.

В некоторых гуманизированных антителах 3D6 антитела положение H58 (CDR-H2 остаток) в области VH занимает I, как, например, в huVHvb3, huVHvb4 и huVHvb5.

В некоторых гуманизированных антителах 3D6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H28 занимает T, H67 занимает V. В некоторых гумани-

зированных 3D6 антителах положения H28 и H67 в области VH занимают T и V, соответственно, как, например, в huVHvb4, huVHvb5, huVHvb6 и huVHvb7.

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H54 занимает D, H56 занимает E. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H54 и H56 (CDR-H2 остатки) в области VH занимают D и E, соответственно, как, например, в huVHvb6 и huVHvb7.

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

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения H91, H93 и H94 в области VH занимают 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 занимают 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 занимают 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 занимают 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, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 и H109 в области VH занимают 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 занимают 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 занимают 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 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L7 занимает S, L10 занимает S, L15 занимает L, L83 занимает V, L86 занимает Y и L106 занимает I. В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L7, L10, L15, L83, L86 и L106 занимают S, S, L, V, Y и Y, соответственно, как, например, в huVHvb2 и huVLvb3.

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

В некоторых гуманизированных 3D6 антителах положения L7, L10, L15, L83, L86 и L106 в области VL занимают 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 занимают S, S, L, E, R, Q, R, V, Y, Q и I, соответственно, как в huVLvb3.

В некоторых гуманизированных антителах 3D6 переменная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых гуманизированных антителах 3D6 переменная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых гуманизированных антителах 3D6 каждая из переменной области тяжелой цепи и переменной 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 занимает N или T, положение H54 занимает N или D, положение H56 занимает D или E, положение H58 занимает V или I и положение L24 занимает K или R. В некоторых гуманизированных антителах 3D6 CDR-H1 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86. В некоторых гуманизированных антителах 3D6 CDR-H2 согласно Кэботу содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 92. В некоторых гуманизированных антителах 3D6 CDR-L1 согласно Кэботу содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 89.

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 гуманизованных вариантах 3D6 заключается в дополнительных обратных мутациях в каркасных участках переменной области. Множество каркасных остатков, которые не осуществляют контакт с CDR в гуманизованном 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 подаются 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 несколько 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 гуманизованных вариантах 3D6 (будь то консервативные или нет) не оказывают существенного эффекта в отношении аффинности связывания или активности гуманизованного МАТ, то есть, в отношении его способности связываться с тау.

Гуманизованные антитела 3D6 дополнительно характеризуются способностью связываться как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным тау и неправильно свернутыми/агрегированными формами тау. Некоторые гуманизованные антитела характеризуются связыванием с тау человека или наличием другого функционального свойства, такого как ингибирование связывания тау с нейронными клетками или дезагрегация тау, так же или более сильно, чем мышинный 3D6 (например, до 2 раз, 5 раз, 10 раз или 20 раз), чем мышинный 3D6. Такие свойства можно сравнить с помощью любого из анализов, описанных в примерах.

С. Выбор константной области.

Переменные области тяжелой и легкой цепей химерного, венеризованного или гуманизованного 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, изоотипы IgG1 и IgG3 человека характеризуются комплементзависимой цитотоксичностью, а изоотипы 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 легких цепей могут представлять собой лямбда 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 несколько аминокислот на амино- 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 Fc γ , в частности, рецептора Fc γ RI (см., например, US 6,624,821). 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 5,624,821). 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.

Иллюстративная константная область каппа легкой цепи человека имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104 (с N-концевым аргинином или без него). Иллюстративная константная область тяжелой цепи человеческого IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103 (с C-концевым лизином или без него). 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 C-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.

D. Экспрессия рекомбинантных антител.

Известно множество способов получения химерных и гуманизованных 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 C_κ, 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). Иллюстративные последовательности, кодирующие константные области человека, включают SEQ ID NO: 105, которая кодирует константную область человеческого IgG1 (SEQ ID NO: 103), и SEQ ID NO: 106, которая кодирует константную область легкой цепи каппа человека (SEQ ID NO: 104).

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 γ1 и C_κ 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 часов после трансфекции и анализируют методом вестернблоттинга в отношении продукции антитела или методом ELISA в отношении связывания с антигеном. Химерные антитела являются гуманизованными, как описано выше.

Химерные, венеризованные, гуманизованные 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 эписом 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 НЕК293, 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 в себя 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, 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 *Viasore*. 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 5,786,464; US 6,114,148; US 6,063,598; US 7,569,339; WO 2004/050884; WO 2008/012142; WO 2008/012142; WO 2005/019442; WO 2008/107388; WO 2009/027471; и US 5,888,809).

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)), включая полученные из ретровируса векторы, такие как MMLV, HIV-1 и ALV; аденовирусные векторы (см., например, публикацию Bett et al., *J. Virol.* 67, 591 1 (1993)); 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 5,643,576) 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 5,208,036, US 5,264,618, US 5,279,833 и US 5,283,185. 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 полиметилметакрилата и полилактоиды, а также поли(лактоид-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.

Е. 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 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, AroE, 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 K

369 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 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. Антитела 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 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.

IV. 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 заболевания 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 положениях 717 и положениях 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 Аβ42 в СМЖ. Повышенные уровни тау или фосфо-тау и сниженные уровни Аβ42 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.

V. 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 и SEQ ID NO: 83-85). Примеры нуклеиновых кислот включают SEQ ID NO: 30-31, 93-99, 100-102 и 105-106. Необязательно такие нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, и их можно экспрессировать с сигнальным пептидом, присоединенным к вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи. 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.

VI. 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 8,455,622. 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 демен-

ция 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 иммунотоксичных. См., например, патент США № 5,194,594. 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 ризина. См. публикацию Pietersz et al., *Cancer Res.* 48(16):4469-4476 (1998). Объединение приводит к утрате связывающей активности В-цепи ризина, при этом не нарушая ни токсичный потенциал А-цепи ризина, 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, ^mTc, 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 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 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, висмут²¹³, 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 ¹¹⁷Tm; 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 1:S91-S95 (2001).

Терапевтические агенты, 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 De-

livery," 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.

VII. Фармацевтические композиции и способы применения.

При профилактических вариантах применения антитело или фармацевтическую композицию, содержащую указанные антитело или средство, вводят пациенту, предрасположенному 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 вводят пациенту, предрасположенному 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 АроЕ, 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.

Антитела 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, стабилизи-

рующие и/или диспергирующие средства. В качестве альтернативы, антитела могут находиться в лиофилизированной 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 СОМТ, ингибиторами МАО-В, 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. Иллюстративная 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 гуманизированного антитела согласно настоящему изобретению пациенту, и затем посредством обнаружения антитела после его связывания. 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 сканирования ПЭТ. Сканирование ПЭТ можно осуществить с применением, например, общепринятого аппарата для визуализации ПЭТ и вспомогательного оборудования. Сканирование, как правило, охватывает одну или несколько областей головного мозга, которые, как известно, обычно связаны с отложениями тау-белка, и одну или несколько 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, гуманизованное, 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 сигнал 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 приближенно 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 контрольной 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 венированным антителом 3D6), 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 несколько 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 аналогич-

ным 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).

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. Связывание было сопоставлено с сайтами в области MTBR.

Пример 3. Дизайн гуманизованных антител 3D6.

Исходной точкой или донорным антителом для гуманизации являлось антитело 3D6 мыши. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи зрелого m3D6 представлена в виде SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность варибельной 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.

Варибельная область каппа (Vk) 3D6 принадлежит к подгруппе 2 мыши согласно Кэботу, которая соответствует подгруппе 2 человека согласно Кэботу, и варибельная 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 гуманизированного 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 области 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 гуманизированных 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 гуманизированных 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.),

локализованы 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 пироглутамирование,

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 гуманизированных антител показаны для вариабельных областей легкой цепи (табл. 4 и фиг. 2) и вариабельных областей тяжелой цепи (табл. 3 и фиг. 1).

Конструировали 7 вариантов гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи и 3 варианта гуманизированной вариабельной области легкой цепи, содержащие различные пермутации замен: hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, 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 гуманизированных 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. Процент степени гуманизации для гуманизированных цепей VH hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2,

hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6Hvb5, hu3D6VHvb6 и hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO: 76-80 и 90-91, соответственно) и гуманизированных цепей VL hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2 и hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO: 83-85 соответственно) представлен в табл. 8.

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_huFrwk (SEQ ID NO:75)	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)
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	I		Y	I	I	I	I	I	I	I
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_huFwvk (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (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
106	112	Fr4	K	K	K	K	K	K
A								
107	113	Fr4	R			R	R	R

Таблица 5

Обратные мутации и другие мутации V_H , V_L для гуманизированного 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/Чютиа) 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_huFrvk (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

Таблица 8

Процент степени гуманизации тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител 3D6

Вариант V _H или V _L	% степени гуманизации
Hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)	65,3%
Hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)	76,5%
Hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)	81,6%
Hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)	83,7%
Hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)	85,7%
Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	83,7%
Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)	84,7%
Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	82,0%
Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	87,0%
Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)	89,0%

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). Q1E представляет собой обратную мутацию;

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. Не 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. N28T 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;

K38R: представляет собой часто встречающуюся обратную мутацию. Arg наиболее часто встречается в данном положении; по прогнозам, что Arg в данном положении создает две H-связи с Glu 46 в дополнение к одной H-связи, каждая с Asp86 и Tyr90 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 H-связь с G42, помимо основной цепи, образующей H-связи с Gln 39 и Arg 40, таким образом, замещение Lys может повышать стабильность по Q в данном положении; Q43K представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Lys находится в гене зародышевой линии человека IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) 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. N54D и D56E представляют собой мутации выравнивания зародышевой линии. Asp находится в положении N54, а Glu находится в положении N56 в гене IMGT# IGHV1-69-2*01 человеческой зародышевой линии (SEQ ID NO: 25);

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

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

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 H-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. S75T 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;

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 H-связь и солевой мостик с K19; поэтому Glu в данном положении усиливает стабильность антитела; Q81E представляет собой мутацию выравнивания зародышевой линии. Glu находится в гене зародышевой линии человека IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) в данном положении;

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;

Y91F: представляет собой мутацию остатка поверхности взаимодействия и представляет собой обратную мутацию; Tug в данном положении 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. L109V 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.

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 and 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 Туг в данном положении; Туг 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; не наиболее часто встречается в данном положении; не 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)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYYLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFKGKATITADTSSNTAYLQSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGGTTLTVSS

>hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)

EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYYLHWVVRQRPKGKLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFKGRATITADTSTDTAYLESSLTSEDTAVYFCSTLDFWGGTTLTVSS

>hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
 NGDTIYDPKFQGRATITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGGTLVTVSS

hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
 NGDTIYDPKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGGTLVTVSS

>hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
 DGETIYDPKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGGTLVTVSS

>hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
 DGETVYDPKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYFCSTLDFWGGTLVTVSS

>hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
 DGETVYDPKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGGTLVTVSS

вариабельные области легкой цепи каппа

hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)

DVVMVTQPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
 SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCWQGFHPYTFGAGTKLEIKR

>hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)

DVVMVTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
 VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGAGTKLEIKR

>hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)

DVVMVTQSPLSLSVTLGEPASISCRSSQSLSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYLV
 VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGQGTKLEIKR

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 сенсibilizировали захватывающими антителами против 6xHis (фиг. 3A) или поликлональными антителами против тау (Dako №A0024, фиг. 3B), суспендированными в 1х 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 часа 1% БСА в 1х ФБР с последующей инкубацией с рекомбинантным тау человека с полигистидиновой меткой на N-конце белка (фиг. 3A) или без нее (фиг. 3B). 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 ТМВ, и A₄₅₀ измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов.

Сэндвич-ELISA: 96-луночные полистирольные планшеты сенсibilizировали антителами против иммуноглобулинов мыши в 1х ФБР в течение 2 ч при к.т. или 16 ч при температуре 4°C. Нанесенный материал удаляли, и планшеты блокировали в течение 1 часа 1% БСА в 1х ФБР. Затем планшет инкубировали с указанными антителами в идентичных концентрациях, разведенными в 0,1% БСА в 1х 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 ТМВ, и A₄₅₀ измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов. См. фиг. 3С.

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. 3А). Также подтверждали связывание с нативным немеченым белком (фиг. 3В). Для оценки аффинности различных антител в растворе использовали формат сэндвич-ELISA, в котором исследуемые антитела гибридомы применяли в качестве захватывающих реактивов (фиг. 3С).

Пример 5. Аффинность моноклональных антител мыши в отношении тау.

Способы: анализ методом ППР (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 сек. ассоциации и 900 сек. диссоциации. Данные соотносили дважды как к нерелевантному сенсору, не содержащему лиганд антитела, так и к концентрации аналита 0 нМ для учета диссоциации лиганда от захватывающей 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. 4.

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:

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

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

в) 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.

д) 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 1X буфера для считывания Т без поверхностно-активного вещества (разведенного в H₂O) и незамедлительно проводили считывание на приборе MSD SECTOR™ 600. Избежали 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 исследуемо-

го 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. 5.

Пример 7. Активность дезагрегации.

Способы: Агрегация рекомбинантного тау. Очищенный рекомбинантный тау с N-концевой меткой 6xHis сочетали с эквимольными количествами низкомолекулярного гепарина в 1х ФБР (рН 7,4) и инкубировали при температуре 37°C в течение 96 ч на шейкере-качалке. Агрегацию образца подтверждали посредством связывания с тиофлавином 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 помешивания. По окончании эксперимента измеряли агрегацию посредством инкубации образцов с 25 мМ тиофлавином Т и измерения испускаемой флуоресценции (возбуждение/испускание 450/482). Из сигналов вычитали фон образцов буфера.

Результаты: Как показано на фиг. 6, 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 1х 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 фигуре 7, 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 посмертной 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, Бурлинггейм, 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 гу-

манизированной 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 сенсибилизировали рекомбинантным тау человека, суспендированным в 1х 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 1х ФБР. В планшеты добавляли гуманизированный вариант антител в концентрации 1 мкг/мл в 0,1% БСА в 1х ФБР в течение 1 часа 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 сенсибилизировали антителами против иммуноглобулинов человека в 1х ФБР в течение 2 ч при к.т. или 16 ч при температуре 4°C. Нанесенный материал удаляли, и планшеты блокировали в течение 1 часа 1% БСА в 1х ФБР. В планшеты добавляли гуманизированный вариант антител в варьирующих концентрациях, как указано, разведенные в 0,1% БСА в 1х ФБР, в течение 1 ч с последующей промывкой, и добавляли биотинилированный рекомбинантный тау человека, разведенный в 0,1% БСА в 1х ФБР. После промывки добавляли стрептавидин-ПХ, реакцию в планшетах запускали добавлением ТМВ, и A_{450} измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов.

Пример 11. Анализ гуманизированных вариантов 3D6.

Гуманизированные варианты 3D6 анализировали по нескольким характеристикам, включая сродство связывания с мишенью, активность в клеточных анализах, термостабильность, титр экспрессии и наличие агрегации.

Были получены плазмиды, содержащие ДНК, кодирующую тяжелые цепи hu3D6VHvb1, h3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, h3D6VHvb6 и h3D6VHvb7 и легкие цепи hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2, and hu3D6VLvb3. Различные комбинации тяжелых и легких цепей временно экспрессировали в виде интактных антител в клетках НЕК-293, и антитела очищали из кондиционированных сред с использованием хроматографии на основе белка А. Очищенные антитела анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC) для обнаружения наличия агрегации. Результаты представлены в табл. 9 в столбце "% мономера".

Очищенные антитела анализировали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) для определения термостабильности каждого варианта. 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 1хФБР и относительно 1хФБР. Приблизительно 0,5 мл раствора белка и буфера вводили в образец и контрольную ячейку. Калориметрическое сканирование выполняли при скорости сканирования 60°C/час, 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. Результаты представлены в табл. 9 в столбце "Термостабильность (°C)".

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 1хФБР, 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. Результаты представлены в табл. 9 в столбце, обозначенном "Титр экспрессии (мг/л)".

Аффинность очищенных гуманизированных вариантов к тау определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (НИР). Анализ методом НИР проводили с применением прибора Biacore T200 для определения кинетики связывания гуманизированных антител с рекомбинантным тау человека. Для подготовки поверхности сенсора на сенсорный датчик CM3 иммобилизовали антитело против иммуноглобулинов человека (GE Life Sciences) посредством аминного сочетания, и антитело захватывали на уровне, который обеспечивает максимальное связывание 50 Е.О. Над захваченным лигандом пропускали различные концентрации рекомбинантного тау, варьирующиеся от 50-0,62 нМ, при скорости потока 50 мкл/мин. в буфере для анализа (HBS + 0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) одним циклом. Данные соотносили дважды как к нерелевантному сенсору, не содержащему лиганд антитела, так и к концентрации анализата 0 нМ для учета диссоциации лиганда от захватывающей молекулы. Затем данные анализировали с применением глобальной подгонки 1:1. Результаты представлены в табл. 9, в столбце, обозначенном как " k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$), k_{off} (s^{-1}) и K_d (nM)".

Способность очищенных гуманизированных вариантов блокировать интернализацию тау определяли с помощью анализом интернализации клеток. 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, веро-

ятно, блокируют передачу тау. Меченый посредством pHrodo растворимый олигомер 4R0N тау P301L человека (конечная концентрация 1,5 мкг/мл) предварительно инкубировали с гуманизированными вариантами (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 V103 при конечной концентрации 500000 клеток/мл и инкубировали в течение 3-4 часов 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 интернализированный клетками тау. Чем ниже средняя интенсивность флуоресценции, тем меньше количество интернализированного тау и выше блокирующая активность тестируемого антитела. Результаты представлены в табл. 9.

Таблица 9

Биофизические/характеристики экспрессии, аффинность и результаты анализа интернализации для гуманизированных вариантов 3D6

Название антитела		Биофизические/ Характеристики экспрессии			Аффинность			Ингибирование интернализации на основе клеток (при концентрации антител 133 нМ, % ингибирования максимального флуоресцентного сигнала)
Тяжелая цепь	Легкая цепь	Термостабильность (°C)	Титр экспрессии (мг/л)	% мономера	k_{on} (M ⁻¹ с ⁻¹)	k_{off} (с ⁻¹)	K_d (нМ)	
Hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	69.4	176	96	1.40E+06	9.00E-04	0.64	80.0
Hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	80.4	478	98	1.50E+06	5.70E-05	0.04	84.9
Hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)	83.5	435	100	1.60E+06	3.00E-04	0.19	85.0
Hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	80.8	528	100	1.40E+06	1.50E-03	1.07	71.2
Hu3D6VHvb3	Hu3D6VLvb3	83.15	529	100	1.60E+06	1.80E-03	1.13	72.1

(SEQ NO:78)	ID	(SEQ NO:85)	ID							
Hu3D6VHvb4		Hu3D6VLvb2								
(SEQ NO:79)	ID	(SEQ NO:84)	ID	81.3	557	98	6.90E+05	2.90E-03	4.20	61.0
Hu3D6VHvb4		Hu3D6VLvb3								
(SEQ NO:79)	ID	(SEQ NO:85)	ID	83.5	575	100	9.10E+05	3.40E-03	3.74	49.0
Hu3D6VHvb5		Hu3D6VLvb2								
(SEQ NO:80)	ID	(SEQ NO:84)	ID	80.6	597	100	1.80E+06	2.60E-03	1.44	67.2
Hu3D6VHvb5		Hu3D6VLvb3								
(SEQ NO:80)	ID	(SEQ NO:85)	ID	82.9	612	100	2.00E+06	2.80E-03	1.40	67.7
Hu3D6VHvb6		Hu3D6VLvb2								
(SEQ NO:90)	ID	(SEQ NO:84)	ID	79.9	395	100	3.45E+06	3.69E-04	0.107	76.3
Hu3D6VHvb6		Hu3D6VLvb3								
(SEQ NO:90)	ID	(SEQ NO:85)	ID	82.5	350	100	3.54E+06	5.38E-04	0.152	70.0
Hu3D6VHvb7		Hu3D6VLvb2								
(SEQ NO:91)	ID	(SEQ NO:84)	ID	80.6	478	100	3.09E+06	7.79E-04	0.252	74.5
Hu3D6VHvb7		Hu3D6VLvb3								
(SEQ NO:91)	ID	(SEQ NO:85)	ID	83.0	447	99	3.69E+06	7.70E-04	0.209	66.0

Перечень последовательностей.

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTIPEGTTAEEAGIGDTP
 SLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANAT
 RIPA K T P P A P K T P P S S G E P P K S G D R S G Y S S P G S P G T P G S R S R T P S L P T P P T R E P K K V A V V R T
 P P K S P S S A K S R L Q T A P V P M P D L K N V K S K I G S T E N L K H Q P G G G K V Q I I N K K L D L S N V Q S K C
 G S K D N I K H V P G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R
 V Q S K I G S L D N I T H V P G G G N K K I E T H K L T F R E N A K A K T D H G A E I V Y K S P V V S G D T S P R H L S
 N V S S T G S I D M V D S P Q L A T L A D E V S A S L A K Q G L

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK
 KAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANAT R I P A K T P P A P K T P P S S G E P P K S G D R S G Y S S P
 G S P G T P G S R S R T P S L P T P P T R E P K K V A V V R T P P K S P S S A K S R L Q T A P V P M P D L K N V K S K I G
 S T E N L K H Q P G G G K V Q I I N K K L D L S N V Q S K C G S K D N I K H V P G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S
 K C G S L G N I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V Q S K I G S L D N I T H V P G G G N K K I E T H K L T F R
 E N A K A K T D H G A E I V Y K S P V V S G D T S P R H L S N V S S T G S I D M V D S P Q L A T L A D E V S A S L A K
 Q G L

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

MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEAGIGD
 TPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQAN
 A T R I P A K T P P A P K T P P S S G E P P K S G D R S G Y S S P G S P G T P G S R S R T P S L P T P P T R E P K K V A V V
 R T P P K S P S S A K S R L Q T A P V P M P D L K N V K S K I G S T E N L K H Q P G G G K V Q I I N K K L D L S N V Q S
 K C G S K D N I K H V P G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K
 D R V Q S K I G S L D N I T H V P G G G N K K I E T H K L T F R E N A K A K T D H G A E I V Y K S P V V S G D T S P R
 H L S N V S S T G S I D M V D S P Q L A T L A D E V S A S L A K Q G L

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTIPEGTTAEEAGIGDTP
 SLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANAT
 R I P A K T P P A P K T P P S S G E P P K S G D R S G Y S S P G S P G T P G S R S R T P S L P T P P T R E P K K V A V V R T
 P P K S P S S A K S R L Q T A P V P M P D L K N V K S K I G S T E N L K H Q P G G G K V Q I V Y K P V D L S K V T S K
 C G S L G N I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V Q S K I G S L D N I T H V P G G G N K K I E T H K L T F R E
 N A K A K T D H G A E I V Y K S P V V S G D T S P R H L S N V S S T G S I D M V D S P Q L A T L A D E V S A S L A K
 Q G L

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK

KAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQGANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSP
 GSPGTPGSRRTPSLPTPTREPCKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKKNVSKIG
 STENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRV
 QSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGLTSPRHLSN
 VSSTGSIDMVDSPLATLADEVASLAKQGL

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDQDAGLKAEEAGIGD
 TPSLEDEAAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQGAN
 ATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPTREPCKVAVV
 RTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTS
 KCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFR
 ENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGLTSPRHLSNVSSSTGSIDMVDSPLATLADEVASLAK
 QGL

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

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGWIDP
 ENGDTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGGTTLTVSS

SEQ ID NO:8; HCDR1 согласно Кэботу/Чотиа:

GFNIKDYLLH

SEQ ID NO:9; HCDR2 согласно Кэботу:

WIDPENGDTVYDPKFQG

SEQ ID NO:10; HCDR3 согласно Кэботу:

LDF

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

DVVMVTQTPPLTSLVTIGQPASISCKSSQLLSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
 SKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCWQGFHPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:12; LCDR1 мыши согласно Кэботу:

KSSQLLSDGKTYLN

SEQ ID NO:13; LCDR2 мыши согласно Кэботу:

LVSKLDS

SEQ ID NO:14; LCDR3 мыши согласно Кэботу:

WQGFHPYT

SEQ ID NO:15; hu3D6VHv1:

EVQLVQSGAEVVRPGALVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPEQGLEWIGWIDP
 ENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGGTTLTVSS

SEQ ID NO:16; hu3D6VHv2:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGFNIKDYLLHWVRQAPQGLEWMGWID
 PENGDTVYDPKFKQGRVTITADTSTNTAYMELSSLTSEDVAVYYCSTLDFWGGTLVTVSS

SEQ ID NO:17; hu3D6VHv1b:

EVQLVQSGAEVVRPGALVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPE
 NGDTVYDPKFKQKATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGGTLVTVSS

SEQ ID NO:18; hu3D6VHv1bA11:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPGQGLEWIGWIDPE
 NGDTVYDPKFKQGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGGTLVTVSS

SEQ ID NO:19; hu3D6VHv5:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPGQGLEWIGWIDPE
 DGDVYAPKFKQGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGGTLVTVSS

SEQ ID NO:20; hu3D6VLv1:

DVVMVMTQSPLSLVTLGQPASISCKSSQSLSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYL
 VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:21; hu3D6VLv2:

DVVMVMTQSPLSLPVTGQPASISCKSSQSLSDGKTYLNWLLQRPGQSPRRLIYL
 VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:22; hu3D6VLv3:

DVVMVMTQSPLSLPVTGQPASISCKSSQSLSDGKTYLNWLLQRPGQSPRRLIYL
 VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:23; hu3D6VLv4:

DIVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYL
 SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:24; переменная область тяжелой цепи акцептора, учетн. №
 BAC01986.1

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFGSYAIWVRQAPGQGLEWMGRIPI
 LGIATYAQKFKQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRSEDVAVYYCARGKGEFEGMDVWGGQ
 TTVTVSS

SEQ ID NO:25; переменная область тяжелой цепи акцептора, учетн. №
 IMGT#IGHV1-69-2*01

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDYMHVWVQAPGKGLEWMGLVD
 PEDGETIYAEKFKQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT

SEQ ID NO:26; переменная область тяжелой цепи акцептора, учетн. №
 IMGT#IGKJ1*01

QHWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:27; переменная область легкой цепи акцептора, учет. №
 IMG2#IGKV2-30*02, учет. № IMG2#IGKV2-30*02

DVVM2QSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYK
 VSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG2V2Y2CMQGT2HP

SEQ ID NO:28; переменная область легкой цепи акцептора, учет. №
 IMG2#IGKJ2*01

YTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:29; переменная область легкой цепи акцептора, учет. №
 AAZ09048.1

DVVM2QSPLSLVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYR
 VSHWDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG2V2Y2CMQGT2Y2WPI.TFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:30; последовательность нуклеиновой кислоты VH 3D6 мыши:

GAGG2TCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGACCTGTGAGGCCAGGGCCTTAG
 TCAAGTGTCTCTGCAAAGCTCTGGCTTCAACATTAAGACTACTATTTGCACTGGG
 TGAGGCAGAGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCTGAGAAT
 GGTGATACTGTATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACAC
 ATCTCCAATACAGCCTACCTGCAGCTCGGCAGCCTGACATCTGAGGACTGCGCGT
 CTATTTCTGTCTACCTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCA

SEQ ID NO:31; последовательность нуклеиновой кислоты VL 3D6 мыши:

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCTGGTTACCATTGGACAACC
 AGCCTCCATCTCTTGAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATA
 TTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGT
 GTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCT
 GGCAAGGTACACATTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
 CGT

SEQ ID NO:32; CDR-H1 мыши согласно Кэботу

DYLLH

SEQ ID NO:33; CDR-H1 мыши согласно Чотиа

GFNIKDY

SEQ ID NO:34; CDR-H2 мыши согласно Чотиа

DPENGD

SEQ ID NO:35; CDR-H2 мыши согласно АбМ

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
WQGTFFPY

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; Альтернативный 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 из PCT/IB2017/052544

EVQLVQSGAEVVPKALVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPE
NGDVTYDPKFKGATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLLTVSS

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

DVVMVTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQLLSDSGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO:46; hu3D6VHv1bA11B6G2:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPGKGLEWIGWVDP
EDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLELGLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:47; hu3D6VHv1bA11B6H3:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPGKGLEWIGWIDPE
DGDVTYAPKFQGRATITADTSTDTAYLELGLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:48; hu3D6VHv1c:

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGFNFKDYLLHWVRQRPEQGLEWIMGWIDP
ENGDTVYDEKFKGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:49; hu3D6VHv1d:

EVQLVQSGAEVVKRPGALVKISCKASGYTFTDYHLHWVRQRPEQGLEWMGWVD
PEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGGTTLTVSS

SEQ ID NO:50; hu3D6VHv1e:

EVQLVQSGADVVKPGALVKISCKASGFTIKDYHLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPE
NGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLELGLTSEDVAVYFCSTLDFWGGTTLTVSS

SEQ ID NO:51; hu3D6VHv1f:

EVQLVQSGADVVKPGALVKISCKASGFTIKDYHLHWVRQRPGQGLEWIGWVDP
EDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELGSLTSEDVAVYFCSTLDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:52; hu3D6VHv3:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYHLHWVRQAPGKGLEWMGWIDP
ENGDVYDPKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGGTTLTVSS

SEQ ID NO:53; hu3D6VHv3b:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYNFKDYHLHWVRQAPGKGLEWMGWID
PENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDVAVYYCSTLDFWGGTTLTVSS

SEQ ID NO:54; hu3D6VHv3c:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYTFTDYHLHWVRQAPGKGLEWMGWVD
PEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDVAVYYCSTLDFWGGTTLTVSS

SEQ ID NO:55; hu3D6VHv4:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKVSGFNIKDYHLHWVRQRPGKGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFQKATITADTSTNTAYLELGLTSEDVAVYYCSTLDFWGGTTLTVSS

SEQ ID NO:56; hu3D6VHv4b:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYNFKDYHLHWVRQRPGKGLEWMGWID
PENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTDTAYLELGLTSEDVAVYYCSTLDFWGGTTLTVSS

SEQ ID NO:57; hu3D6VHv4c:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYTFTDYHLHWVRQRPGKGLEWMGWVD
PEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTDTAYLELGLTSEDVAVYYCSTLDFWGGTTLTVSS

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

GFNFKDYHLH

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)

GYNFKDYLLH

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).

WIDPENGDTVYDEKFQG

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

WVDPEDGDTVYAEKFQG

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

WIDPENGDTVYAEKFQG

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

LDY

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

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NDDTEYAPKFQGRATLTTDTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCTPLDYWGQGTSTVTVSS

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

GLNIKDYIHW

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

WIDPENDDTEYAPKFQG

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

LDY

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

KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIQWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGNSEYAPRFQ GKATMTADTSLNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCNADLHDIYWGQGTTLT
VSS

SEQ ID NO:71; консенсусная аминокислотная последовательность VH из фигур 4А и 4В в PCT/IB2017/052544

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRPGQGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFKQGRVTITADTSTNTAYLELGLSLTSEDTAVYFCSTLDFWGGTTLTVSS

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

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYHLHWVRQRPEQGLEWIGWIDP
ENGDVYDPKFKQKATITADTSSNTAYLQLGLSLTSEDTAVYFCSTLDFWGGTTLTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

DVVMVTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLV
SKLDSGVPDRFTGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGFHFPYTFGGGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

EVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYIFNNYWINWVKQRPGQGLEWIGQIYPG
DGDNTYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREGYIVYWGQGLTVT
VSA

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

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPA
NGNTKYDPKFKQKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCASYYGIYWGQGLTVS
S

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

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYHLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFKQKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGGTTLTVSS

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

EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
NGDTVYDPKFKGRATITADTSTDTAYLESSLTSEDVAVYFCSTLDFWGGQTLVTVSS

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

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
NGDTIYDPKFKGRATITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGGQTLVTVSS

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

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYHLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
NGDTIYDPKFKGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGGQTLVTVSS

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

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYHLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
DGETIYDPKFKGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGGQTLVTVSS

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

DVVLQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYVV
SKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHTFPFTFGSGTKLEIK

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

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCEQGTHTFPFTFGAGTKLELK

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

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQLLSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCWQGTHTFPYTFGAGTKLELKR

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

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHFPYTFGAGTKLEIKR

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

DVVMTQSPLSLSVTLGEPASISCRSSQSLDSDGKTYLNWLQRPQGSPRRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHFPYTFGQGTKLEIKR

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

GFTIKDYLLH

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

WIDPENGDTIYDPKFQG

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

WIDPEDGETIYDPKFQG

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

RSSQSLDSDGKTYLN

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

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
DGETVYDPKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYFCSTLDFWGGTLVTVSS

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

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPE
DGETVYDPKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGGTLVTVSS

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

WIDPEDGETVYDPKFQG

SEQ ID NO:93; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая
варибельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb1

CAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGGCAGAATTGGTCAAGCCCGGAGCGTCA
GTGAAGCTGAGCTGCACCGCCTCCGGCTTCAACATCAAAGACTACTATCTTCACTGG
GTCAAGCAACGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGTTGGATCGACCCAGAAAA
CGGCGACACCGTGTACGATCCGAAGTTTCAGGGGAAGGCCACCATCACTGCTGATA
CGTCCTCGAACACCGCCTACCTCCAAGTGAAGTCCCTGACTTCCGAGGACACTGCCG
TGACTTCTGTTCACCTGGACTTCTGGGGACAGGGAACCTACCCTACCGTGTCTCT
CGGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACTT
CGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

SEQ ID NO:94; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая
варибельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb2

GAAGTGCAGCTCGTGCAGTCCGGTGCCGAAGTCGTGAAACCGGGAGCCAGC
GTGAAGATTAGCTGCAAGGCCTCAGGGTTCAACATCAAGGACTATTACCTTCACTGG
GTCAGACAGCGGCCTGGAAAGGGCTTGGAGTGGATCGGATGGATTGACCCGAGAAA
CGGCGACACCGTGTACGATCCGAAGTTTCAGGGCCGCGCAACCATCACTGCTGACA
CCTCCACCGATACCGCGTACCTGGAAGTCTCGAGCCTGACTTCCGAGGATACGGCCG
TGACTTCTGTTCACCTGGACTTCTGGGGACAAGGGACTCTGGTCACCGTGTCTCT
CGGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACTT
CGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

SEQ ID NO:95; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая
варибельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb3

GAGGTGCAACTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCGTGAAAGCCGGGAGCCACC
GTGAAGATTTCTGTCAAAGCGTCAGGGTTTAAACATCAAGGACTACTATCTGCACTGG
GTCCGCCAGAGGCCCGGGAAGGGCCTCGAGTGGATCGGTTGGATCGACCCTGAAAA
CGGCGACACCATCTACGATCCAAAGTTCCAGGGCAGAGCCACTATTACCGCTGACA
CGAGCACCGATACTGCATACATGGAATTGTCTCCCTGCGGTCCGAGGATACTGCCG
TGTAATACTGTAGCACCTGGACTTCTGGGGACAGGGAACCTTGTGACCGTGTCTGT
CCGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACTT
CGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

SEQ ID NO:96; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая
варибельную область тяжелой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VHvb4

GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCCGGTGCTGAAGTCGTGAAAGCCGGCGCAACTG
TGAAGATTAGCTGCAAGGCCTCAGGGTTACGATCAAGGACTACTATCTGCACTGG

GTCCGCAACGGCCAGGAAAGGGACTGGAGTGGATCGGATGGATCGATCCTGAAAA
 CGGCGACACCATCTACGACCCGAAATTCAGGGGAGAGTGACCATTACCGCCGATA
 CCTCCACCGACACTGCGTACATGGAAGTGTCCAGCCTTCGGTCCGAGGACACCGCCG
 TGTACTACTGTTTCGACCCTGGATTTCTGGGGACAGGGCACTCTCGTGAAGTGTGTCT
 CCGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCCGCTGGCCCCGTCCTCAAGTCCACTT
 CGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

SEQ ID NO:97; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая
 переменную область тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv5

GAAGTGCAACTGGTGCAGTCCGGCGCAGAAGTCGTGAAGCCTGGAGCCACC
 GTGAAGATCAGCTGCAAGGCCTCCGGCTTACCATCAAAGACTACTACTTGCCTGAG
 GTCAGACAGCGCCAGGAAAGGGTCTGGAATGGATTGGATGGATTGACCCCGAGGA
 CGGGGAGACTATCTACGATCCGAAGTTTCAGGGCCGGGTACCATCACGGCTGATA
 CCTCGACCGACACTGCGTACATGGAACCTTCTCGCTGCGGTCCGAGGACACCGCCG
 TGATTTACTGTTCCACCCTGGATTTCTGGGGACAGGGGACTCTCGTGAAGTGTGTCAA
 GCGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCCGCTGGCCCCGTCCTCAAGTCCACTT
 CGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

SEQ ID NO:98; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая
 переменную область тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv6

GAAGTGCAACTGGTGCAGTCCGGCGCAGAAGTCGTGAAGCCTGGAGCCACC
 GTGAAGATCAGCTGCAAGGCCTCCGGCTTACCATCAAAGACTACTACTTGCCTGAG
 GTCAGACAGCGCCAGGAAAGGGTCTGGAATGGATTGGATGGATTGACCCCGAGGA
 CGGGGAGACTGTGTACGATCCGAAGTTTCAGGGCCGGGTACCATCACGGCTGATA
 CCTCGACCGACACTGCGTACATGGAACCTTCTCGCTGCGGTCCGAGGACACCGCCG
 TGATTTCTGTTCCACCCTGGATTTCTGGGGACAGGGGACTCTCGTGAAGTGTGTCAA
 GCGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCCGCTGGCCCCGTCCTCAAGTCCACTT
 CGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

SEQ ID NO:99; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая
 переменную область тяжелой цепи гуманизованного антитела 3D6 hu3D6VHv7

GAAGTGCAACTGGTGCAGTCCGGCGCAGAAGTCGTGAAGCCTGGAGCCACC
 GTGAAGATCAGCTGCAAGGCCTCCGGCTTACCATCAAAGACTACTACTTGCCTGAG
 GTCAGACAGCGCCAGGAAAGGGTCTGGAATGGATTGGATGGATTGACCCCGAGGA
 CGGGGAGACTGTGTACGATCCGAAGTTTCAGGGCCGGGTACCATCACGGCTGATA
 CCTCGACCGACACTGCGTACATGGAACCTTCTCGCTGCGGTCCGAGGACACCGCCG
 TGATTTACTGTTCCACCCTGGATTTCTGGGGACAGGGGACTCTCGTGAAGTGTGTCAA

GCGCCAGCACTAAGGGGCTAGCGTCTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACTT
 CGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

SEQ ID NO:100; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая
 переменную область легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLvb1

GATGTCGTGATGACCCAGACGCCGCTGACCCTGTCCGTGACTATCGGCCAGC
 CCGCGTCCATTTCTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTGCTGGACTCCGACGAAAGACCT
 ACCTGAACTGGCTGTTGCAACGGCCGGACAGTCACCAAGCGCTCATCTATCTGG
 TGTTCAAGCTCGACTCGGGAGTGCCTGATAGTTTTTCGGGATCCGGCAGCGGGACC
 GACTTACCCTGAAAATCTCAAGAGTGAAGCCGAGGACCTGGTGTCCATTACTGT
 TGGCAGGGTACCCACTTCCCATACTTTTCGGGGCCGGCACTAAGCTCGAACTGAAG

SEQ ID NO:101; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая
 переменную область легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLvb2

GATGTCGTGATGACCCAGTCGCCGCTGTCCCTGTCCGTGACCCTGGGACAGC
 CAGCCTCCATTAGCTGCAAGAGCAGCCAGTCCTTGCTGGACTCAGACGAAAGACC
 TATCTGAACTGGCTGCTGCAAAGGCCCGCCAGTCCCCGAAGAGACTCATCTACCTC
 GTGTCGAAGCTGGACTCCGGCGTGCCTGATCGTTCTCGGGTCCGGGTCTGGAACCT
 GACTTACCCTCAAAATCTCACGGGTCGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGT
 TGGCAGGGTACCCACTTCCCCTACACTTTTCGGGGCCGGAACTAAGCTTGAGATCAAG

SEQ ID NO:102; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая
 переменную область легкой цепи гуманизированного антитела 3D6 hu3D6VLvb3

GATGTCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGTCCCTGAGCGTGACTCTGGGGGAAC
 CGGCCAGCATTTTCATGCCGGTCTCACAATCGCTGCTCGACTCCGACGAAAGACCT
 ATTTGAACTGGCTGCAGCAAAGACCAGGACAGTCCCCTCGCCGGCTCATCTACCTGG
 TGTTCAAGCTTGACTCGGGCGTGCCGATAGTTTCTCCGGTCCGGAAGCGGCACC
 GACTTCACTCTGAAAATCTCGCGCTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTCTACTACTGT
 TGGCAGGGTACCCACTTCCCCTACAGTTTGGCCAGGGTACCAAGCTCGAGATCAAG

SEQ ID NO:103; аминокислотная последовательность примера IgG1
 константной области тяжелой цепи

ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:104; аминокислотная последовательность примера константной области легкой цепи каппа

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:105; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пример IgG1 константной области тяжелой цепи

GCCAGCACTAAGGGGCTAGCGTCTTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCAC
TTCGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCGG
TCACCGTGTCTGGAACCTCGGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACTTCCCTGCGG
TGCTGCAGTCTCCGGGCTCTACTCGCTGTCAAGCGTGGTACCCGTCCTCCGAGTCCAT
CCCTGGGTACTCAGACCTACATTTGCAACGTGAACCACAAACCTTCCAACACCAAGG
TCGACAAGAAAGTGAGCCTAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCGCTGT
CCCCGCCCTGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTCTCTTCCCGCCTAAGCCGAAG
GACACTCTGATGATCTCGAGAACCCTGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCC
CACGAGGATCCGGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAAGTCCATAA
CGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAACAGTACAACCTCAACTACCGGGTGGTGTGAG
TGCTGACCGTGTGCACCAAGATTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTC
TCCAACAAGGCGCTGCCGGCCCCCATTGAAAAGACCATCAGCAAGGCTAAGGGCCA
GCCCCGGGAACCACAGGTCTACACCTTGCCCCCTTCCCGGGAGGAAATGACCAAGA
ACCAAGTGTGCTGACGTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCATCTGACATCGCCGTGG
AGTGGGAAAGCAACGGCCAGCCGGAACAACAACACTACAAGACTACCCCGCCTGTGCTG
GACTCCGACGGCTCGTTCTCTCTGTATTCCAAGCTCACCGTGGATAAGTCCAGATGG
CAGCAGGGCAATGTGTTTCAGCTGCAGCGTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAACCACTA
CACTCAGAAATCACTGTCCCTTCCCCCGGAAAGTAA

SEQ ID NO:106; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пример константной области легкой цепи каппа

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT
GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC
CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG
AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG
CCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, специфично связывающееся с тау человека, содержащее зрелую вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR H1, H2 и H3, содержащие SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, где положение H28 согласно Кэботу занимает N или T, H54 согласно Кэботу занимает N или D, H56 согласно Кэботу занимает D или E и положение H58 согласно Кэботу занимает V или I, и зрелую вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR L1, L2 и L3, содержащие SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно, причем, по выбору, положение L24 согласно Кэботу занимает K или R, при этом по меньшей мере одно из следующих положений согласно Кэботу занимает аминокислота, как указано: H1 занимает Q, H5 занимает Q, H11 занимает L, H20 занимает L, H23 занимает T, H38 занимает K, H75 занимает S, H56 занимает E, H58 занимает I, L10 занимает T, L17 занимает E, L24 занимает R, L37 занимает Q, L83 занимает L, L86 занимает H, L100 занимает A или Q, L106 занимает L.

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что CDR-H1 содержит SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 86, CDR-H2 содержит SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 92, CDR-H3 содержит SEQ ID NO: 10, CDR-L1 содержит SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 89, CDR-L2 содержит SEQ ID NO: 13 и CDR-L3 содержит SEQ ID NO: 14.

3. Антитело по п.1, отличающееся тем, что CDR-H1 содержит SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 86, CDR-H2 содержит SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 88, CDR-H3 содержит SEQ ID NO: 10, CDR-L1 содержит SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 89, CDR-L2 содержит SEQ ID NO: 13 и CDR-L3 содержит SEQ ID NO: 14.

4. Антитело по п.1, отличающееся тем, что CDR-H1 содержит SEQ ID NO: 86, CDR-H2 содержит

SEQ ID NO: 92, CDR-H3 содержит SEQ ID NO: 10, CDR-L1 содержит SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 89, CDR-L2 содержит SEQ ID NO: 13 и CDR-L3 содержит SEQ ID NO: 14.

5. Антитело по п.1, отличающееся тем, что CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 86; CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 92; и CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 89.

6. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что антитело представляет собой гуманизованное антитело, венированное антитело или химерное антитело.

7. Антитело по п.6, представляющее собой гуманизованное антитело.

8. Антитело по п.7, содержащее гуманизованную зрелую переменную 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 переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 83-85.

9. Гуманизованное антитело по п.8, отличающееся тем, что зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 76-80 и SEQ ID NO: 90-91, и зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 83-85.

10. Антитело по любому из пп.1-9, которое представляет собой интактное антитело.

11. Антитело по любому из пп.1-9, которое представляет собой связывающий фрагмент.

12. Антитело по любому из пп.1-10, которое представляет собой IgG1 человека.

13. Гуманизованное антитело по любому из пп.6-9, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи и указанная зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи.

14. Гуманизованное антитело по п.13, отличающееся тем, что указанная константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области тяжелой цепи человека, которая характеризуется пониженным связыванием с рецептором Fcγ по сравнению с природной константной областью тяжелой цепи человека.

15. Гуманизованное антитело по п.13 или 14, отличающееся тем, что указанная константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1.

16. Гуманизованное антитело по п.15, отличающееся тем, что зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 103, с C-концевым лизином или без него, и/или зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 104.

17. Антитело по п.13, которое характеризуется по меньшей мере одной мутацией в константной области тяжелой цепи - в одной или нескольких позициях 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 и 331 согласно нумерации EU.

18. Антитело по любому из пп.1-10, которое представляет собой IgG2 или IgG4 человека.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, как определено в любом из пп.1-18, и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Нуклеиновая кислота, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь и легкую цепь антитела по любому из пп.1-18.

21. Нуклеиновая кислота по п.20, имеющая последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 30-31, 93-99, 100-102 и 105-106.

22. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую зрелую переменную область тяжелой цепи и зрелую переменную область легкой цепи, функционально связанные с одной или более регуляторными последовательностями, для осуществления экспрессии антитела по любому из пп.1-18, в клетке млекопитающего.

23. Вектор по п.22, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота дополнительно кодирует константную область тяжелой цепи, слитую со зрелой переменной областью тяжелой цепи, и константную область легкой цепи, слитую со зрелой переменной областью легкой цепи.

24. Способ экспрессии антитела в клетке млекопитающего, включающий введение нуклеиновой кислоты по п.20 или 21 в геном трансгенного животного, посредством чего обеспечивается экспрессия антитела.

25. Пара векторов для экспрессии антитела по любому из пп.1-18, причем один из них включает нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелую переменную область тяжелой цепи, а другой включает нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелую переменную область легкой цепи, при этом каждая функционально связана с одной или более регуляторными последовательностями для осуществления экспрессии антитела по любому из пп.1-18 в клетке млекопитающего.

26. Пара векторов по п.25, где вектор, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелую переменную область тяжелой цепи, дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область тяжелой цепи, а вектор, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелую переменную область легкой цепи, дополнительно включает

нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область легкой цепи.

27. Способ экспрессии антитела в клетке млекопитающего, включающий введение пары векторов по п.25 в геном трансгенного животного, посредством чего обеспечивается экспрессия антитела.

28. Способ получения гуманизированного, химерного или венерированного антитела по п.6, причем указанный способ включает:

(а) культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела, так чтобы указанные клетки секретировали антитело; и

(b) очистку указанного антитела из среды для культуры клеток.

29. Способ получения линии клеток, продуцирующей гуманизированное, химерное или венерированное антитело по п.6, причем указанный способ включает в себя:

(а) введение вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи антитела и селективируемый маркер, в клетки;

(b) размножение указанных клеток в условиях для отбора клеток, которые содержат увеличенное количество копий вектора;

(c) выделение единичных клеток из отобранных клеток;

(d) создание банка клеток, клонированных из единичной клетки, отобранной на основании выхода антитела.

30. Применение эффективного количества антитела по любому из пп.1-18 в приготовлении лекарственного средства для ингибирования или снижения агрегации тау у субъекта, который страдает от опосредованного тау амилоидоза или подвержен риску развития опосредованного тау амилоидоза.

31. Применение эффективного количества антитела по любому из пп.1-18 в приготовлении лекарственного средства для лечения или осуществления профилактики вызванного тау заболевания у субъекта.

32. Применение по п.31, отличающееся тем, что указанное вызванное тау 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 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) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

33. Способ обнаружения отложений тау-белка у субъекта, страдающего от или подверженного риску развития заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, причем указанный способ включает введение указанному субъекту антитела, как определено в любом из пп.1-18, и обнаружение антитела, связавшегося с тау, у указанного субъекта.

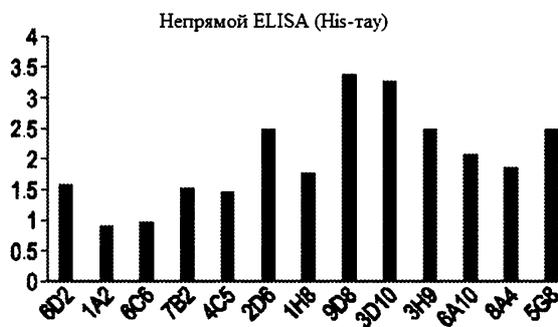
34. Способ по п.33, отличающийся тем, что указанное заболевание, связанное с агрегацией или накоплением тау, представляет собой болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичную возрастную таупатию, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическую деменцию или деменцию боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь аргирофильных зерен, глобулярную глиальную таупатию, амиотрофический 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) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

	10	20	30	40	
3D6VH мыши	E V Q L Q Q S G	A D L V R P G A L V X 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*C1	E V Q L V Q S G	A E V V K P G A T V X I S C K V S	G Y T F T D Y Y M H W V Q Q A		40
2RCS VH hFrwk	Q V Q L Q Q S G	A E L V K P G A S V X L S C T A S	G F N I K D T Y M H W V K Q R		40
hu3D6 Vhvb1	Q V Q L Q Q S G	A E L V K P G A S V X 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 G A T V X 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 G A T V X 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 G A T V X 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 G A T V X 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 G A T V X 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 G A T V X I S C K A S	G F T I K D Y Y L H W V R Q R		40
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*C1	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 hFrwk	P E Q G L E W I G R	I D P A N G E N T K Y D P K F Q G K A T	I T A D T S S N T A Y		80
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
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 L T V S S		112	
IGHV1-69-2*C1	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 hFrwk	L Q L S S L T S E D T	A V Y Y C A S Y Y G I Y W G Q G T L T 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 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	

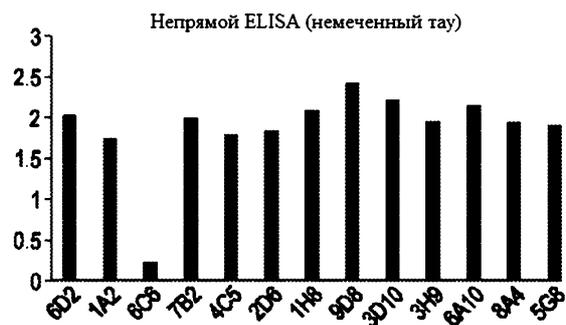
Фиг. 1

	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			
ARX71335_VL_hFrwk	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			
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			
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			
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			
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			
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			
ARX71335_VL_hFrwk	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			
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			
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			
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			
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			
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 R			
ARX71335_VL_hFrwk	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			
IGKV2-30*02	S R V E A E D V G V Y Y C M Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K			
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 R			
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 R			
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 R			

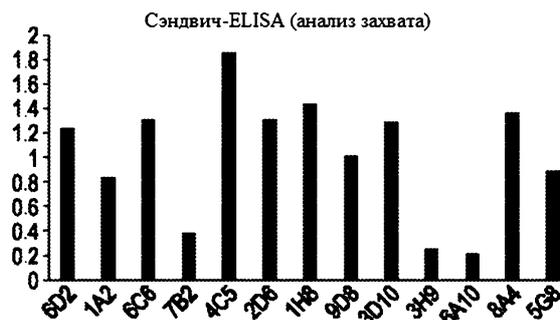
Фиг. 2



Фиг. 3А



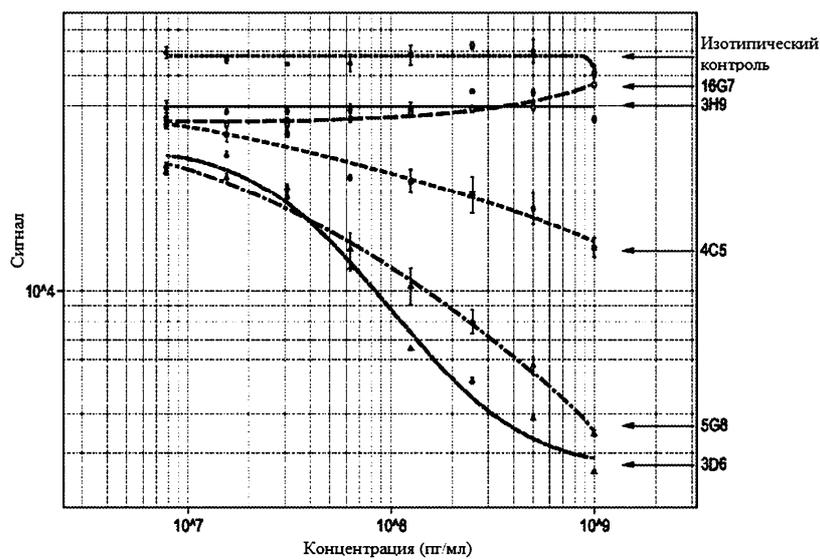
Фиг. 3В



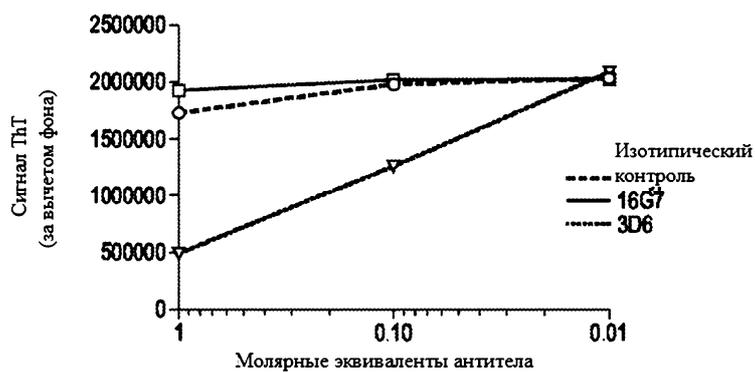
Фиг. 3С

Название	k_a ($M^{-1}c^{-1}$)	k_d (c^{-1})	KD (н.М)
3D6	2.58×10^6	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	3.75×10^6	2.54×10^{-3}	6.78
6D2	3.83×10^6	3.18×10^{-3}	8.29
7G6	5.76×10^6	3.32×10^{-3}	5.77
8A4	5.99×10^6	2.27×10^{-3}	3.8

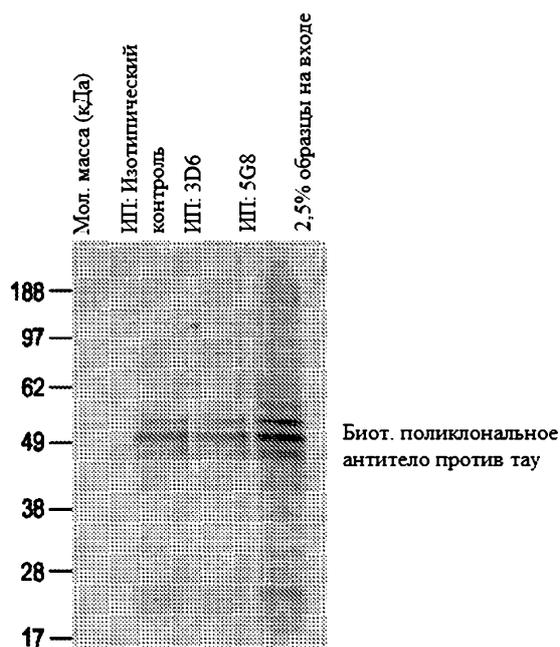
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

