

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048178**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.31

(21) Номер заявки
202290880

(22) Дата подачи заявки
2018.02.27

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) **ГУМАНИЗИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ
КОГНИТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И АГЕНТ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ КОГНИТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ С ЕГО
ПРИМЕНЕНИЕМ**

(31) **JP 2017-035594**

(32) **2017.02.27**

(33) **JP**

(43) **2023.01.12**

(62) **201991726; 2018.02.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТЭИДЗИН ФАРМА ЛИМИТЕД (JP);
МЕРК ШАРП И ДОУМ ЭлЭлСи (US)**

(72) Изобретатель:
**Эгути Хироси, Мураками Такаси,
Намики Наоко, Танокура Акира
(JP), Бейкер Джинн Э., Парментье
Баттёр Софи, Яблонски Анжела
Мари, Малашок Даниэль Стивен,
Мечковски Карл, Рагхунатхан
Гопалан (рагху) (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A1-2015183854
WO-A2-2015200806
US-A1-2012087861
WO-A2-2014028777**

(57) В изобретении предложены способы применения композиций гуманизированных антител, связывающих тау-белок, который является фосфорилированным по серину в положении 413.

B1

048178

048178

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Заявка на данный патент испрашивает приоритет по заявке на патент Японии № 2017-035594, поданной 27 февраля 2017 г., содержание которой включено посредством ссылки в полном объеме.

Перечень последовательностей

Изобретение содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и включенный в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 27 февраля 2018 г., называется 063785-06-5002-WO-SeqLstg_ST25.txt и имеет размер 323584 байт.

Область техники

Настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу для применения при терапевтическом или профилактическом лечении когнитивных расстройств, способу получения гуманизированного антитела, терапевтическому или профилактическому агенту от когнитивных расстройств, в котором используется указанное антитело, и способам лечения или предотвращения когнитивных расстройств с помощью терапевтических агентов, раскрытых в данном документе. Более конкретно, данное изобретение относится к новому гуманизированному антителу против фосфорилированного тау-белка, обладающему превосходным эффектом улучшения когнитивной функции, способу получения гуманизированного антитела, терапевтическому или профилактическому агенту от когнитивных расстройств, содержащему гуманизированное антитело, и способам лечения или предотвращения когнитивных расстройств с помощью гуманизированных антител против фосфорилированного тау-белка.

Уровень техники

Когнитивное расстройство или слабоумие представляет собой состояние, при котором развитый интеллект ухудшается по какой-то приобретенной причине, что приводит к затруднениям с социальной адаптацией. Когнитивные расстройства классифицируются как нейродегенеративные заболевания, сосудистые когнитивные заболевания, прионные заболевания, инфекционные заболевания, метаболические/эндокринные заболевания, травматические и церебральные хирургические заболевания и токсические заболевания (см. Toshifumi Kishimoto & Shigeki Takahashi (Edit.), "STEP Series Seishinka" (Японский документ), 2th Edition, Kaibashobo, 2008, p. 103-104). По состоянию на 2010 год в Японии насчитывалось около 2,1 миллиона пациентов с деменцией, при этом показатель распространенности заболеваемости составлял от 8 до 10% или даже более 10% среди пожилых людей старше 65 лет, и это было признано серьезной проблемой во всемирном стареющем обществе (Takashi Asada, "Igaku no Ayumi" (Японский документ), supplementary volume, "Cognitive disorders", Ishiyaku Publishing, 2011, p. 5-10). Данные об основных заболеваниях когнитивных расстройств показывают, что большинство из них являются нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера (БА) и лобно-височная лобарная дегенерация (ЛВЛД), при этом около 35% являются БА, около 15% являются комбинацией БА и цереброваскулярного заболевания и 5% являются ЛВЛД (Id.) Когнитивные расстройства, связанные с нейродегенеративными заболеваниями, характеризуются незаметным ухудшением памяти и/или изменениями личности, которое прогрессирует в течение по меньшей мере шести месяцев или более. Нейродегенеративные процессы сильно коррелируют со степенью нарушения когнитивной функции, а связанные с ними системные характеристики представляют собой наличие нейрофибриллярных клубков (NFT) (Alistair Burns et al. (Edit.), Dementia, 3rd Edition, 2005, CRC Press, p. 408-464).

Тау-белок представляет собой белок, кодируемый геном MAPT, который находится на хромосоме 17 (17q21) в геноме человека. Тау-белок является одним из белков, связывающих микротрубочки, в избытке экспрессируемых в центральной нервной системе. Было обнаружено, что тау является основным составляющим белком в парных спиральных филаментах и прямых филаментах, образующих NFT при БА, одном из наиболее выраженных нейродегенеративных заболеваний, а его внутриклеточное накопление было продемонстрировано при различных невропатологических состояниях.

Тау был впервые связан с нейродегенеративными заболеваниями на основании связи между мутациями в гене MAPT и накоплением тау при лобно-височной деменции с паркинсонизмом, сцепленной с хромосомой 17 (FTDP-17). Сообщалось о более чем 40 генных мутациях в гене MAPT в отношении FTDP-17 (Tetsuaki Arai, "Shinkei Naika" (Японский документ), Vol. 72, special number, (Suppl.6), 2010, p. 46-51). Предполагается, что эти генные мутации изменяют соотношения между изоформами тау или изменяют структуру и изменяют взаимодействие между мутантным тау и микротрубочками, способствуя тем самым развитию патологии. Однако, в отличие от наследственных нейродегенеративных заболеваний, мутации в MAPT редко наблюдаются при спорадических нейродегенеративных заболеваниях, таких как БА. Кроме того, тау, накопленный при нейродегенеративных заболеваниях, характеризуется высокой степенью модификации путем фосфорилирования. Кроме того, у пациентов с легкими когнитивными нарушениями (MCI) наблюдается корреляция между уровнем фосфорилированного тау в спинномозговой жидкости и степенью атрофии гипофиза, что позволяет предположить, что фосфорилированный тау является высоконадежным биомаркером нейродегенерации у пациентов с таупатией (Wendy Noble et al., Expert Opinion on Drug Discovery, 2011, Vol. 6, No.8, p. 797-810). На основании этих результатов были предприняты попытки разработать лечение с использованием ингибиторов против киназ, которые являются ферментами, участвующими в фосфорилировании, и, в частности, против бета GSK-3, для ингиби-

рования избыточного фосфорилирования тау (Id). Однако стоит вопрос о возможных побочных эффектах, поскольку киназы, такие как бета GSK-3, участвуют не только в патологических состояниях, но и в регуляции функций в нормальных физиологических процессах. Фактически, некоторые сайты, в которых тау фосфорилируется с помощью бета GSK-3, совпадают с сайтами фосфорилирования тау, наблюдаемыми в эмбриональном и нормальном мозге человека (Burnes, et. al., выше), что указывает на возможность того, что эта стратегия может влиять на нормальную функцию тау.

Хотя считалось, что происхождение внеклеточного тау связано с утечкой из дегенерированных нервных клеток в результате гибели клеток, недавние исследования показали, что после избыточного внутриклеточного фосфорилирования тау процессируется, а затем активно секретируется из клетки. Считается, что фосфорилированный тау, секретируемый из клетки, дефосфорилируется в определенных сайтах фосфорилирования и впоследствии действует на мускариновые рецепторы M1 и M3 окружающих клеток, что приводит к различным эффектам, таким как стимулирование внутриклеточного фосфорилирования тау и содействие гибели клеток. (Miguel Diaz-Hernandes et al., Journal of Biological Chemistry, 2010, Vol. 285, No. 42, p. 32539-32548 и Venessa Plouffe et al., PLoS ONE, 2012, Vol. 7, p. 36873). Сообщалось об экспериментах, связанных с иммунотерапией таупатий с использованием тау-белка в качестве мишени, как попытках, направленных на выполнение специфического действия против тау (см. Noble, выше, Kishimoto, выше, Asada, выше и Burns, выше).

Основными симптомами когнитивных расстройств человека являются ухудшение памяти и нарушение когнитивных функций, что особенно важно с учетом роли когнитивной функции в способности к суждению, коммуникации и исполнению на основе памяти. С другой стороны, моторная функция, хотя она и является симптомом, характерным для лобно-височной деменции с паркинсонизмом, сцепленной с хромосомой 17 (FTDP-17), и болезни Альцгеймера в терминальной стадии, не обязательно является основным симптомом, проявляющимся при когнитивных расстройствах. Следовательно, основной проблемой, которую следует учитывать при лечении когнитивных расстройств, является улучшение когнитивных функций. При этом в настоящее время существуют подходящие животные модели для исследования нарушений когнитивной функции, связанных с таупатией, которые позволили бы идентифицировать терапевтический или профилактический агент для лечения когнитивных расстройств. Кроме того, не существует такого агента, который проявлял бы специфические и превосходные эффекты против когнитивных расстройств.

В связи с терапевтическими и профилактическими применениями против когнитивных расстройств у людей существует потребность в гуманизованном антителе против фосфорилированного тау-белка, которое не только обладает высокой аффинностью связывания с фосфорилированным тау, но также проявляет пониженную антигенность для организма человека.

Сущность изобретения

На этом фоне среди большого числа фосфорилированных сайтов в тау-белке, которые могут подвергаться аномальному фосфорилированию в условиях болезни Альцгеймера, авторы данного изобретения сосредоточились на фосфорилированном сайте остатка серина в положении 413 (Ser413) и преуспели в получении поликлонального антитела кролика и моноклонального антитела мыши, которые являются специфичными к Ser413-фосфорилированному тау. Авторы данного изобретения также вводили моноклональные антитела мыши модельным мышам с когнитивными расстройствами, которые демонстрировали аномальную экспрессию фосфорилированных тау-белков, и подтвердили, что наблюдалось улучшение когнитивных функций (WO2013/180238A).

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к белкам, таким как антитела, которые содержат антигенсвязывающую часть, которая специфически связывается с тау-белком, который является фосфорилированным по остатку серина 413 (pS413-тау). В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие белки. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены клетки, которые содержат такие нуклеиновые кислоты, кодирующие белки. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы лечения таупатии (например, болезни Альцгеймера) путем введения нуждающемуся в этом пациенту белков, нуклеиновых кислот или клеток, описанных в данном документе.

Соответственно, в некоторых аспектах изобретение относится к гуманизованному антителу или его фрагменту или производному, которое вызывает реакцию антиген-антитело с тау-белком или тау-пептидом, фосфорилированным по меньшей мере в аминокислотном остатке, соответствующем Ser413 SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях гуманизованное антитело или его фрагмент или производное имеет равновесную константу диссоциации, равную $1,86 \times 10^{-8}$ М или менее, для тау-белка или тау-пептида.

В дополнительных аспектах гуманизованное антитело или его фрагмент или производное имеет улучшенную селективную аффинность с фосфорилированным тау-белком (или тау-пептидом, например, SEQ ID NO: 8) по сравнению с нефосфорилированным тау-белком (или тау-пептидом, например, SEQ ID NO: 69).

В дополнительном аспекте гуманизованное антитело или его фрагмент или производное, описанные в данном документе, обладают улучшенной способностью проникать в мозг при введении в кровь.

В дополнительном аспекте гуманизованное антитело или его фрагмент или производное содер-

ласти тяжелой цепи и последовательность VL48 в качестве вариабельной области легкой цепи; (f) последовательность VH11 в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательность VL50 в качестве вариабельной области легкой цепи; (g) последовательность VH12 в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательность VL48 в качестве вариабельной области легкой цепи; (h) последовательность VH47 в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательность VL48 в качестве вариабельной области легкой цепи; (i) последовательность VH61 в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательность VL48 в качестве вариабельной области легкой цепи; (j) последовательность VH62 в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательность VL48 в качестве вариабельной области легкой цепи; (k) последовательность VH64 в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательность VL47 в качестве вариабельной области легкой цепи; (l) последовательность VH64 в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательность VL48, и (m) последовательность VH65 в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательность VL47.

В дополнительном аспекте изобретение относится к агенту для лечения или предотвращения деменции, содержащему гуманизованное антитело или его фрагмент или производное, как описано в данном документе.

В дополнительном аспекте изобретение предоставляет способы и агенты для лечения или предотвращения деменции или таупатии, включая болезнь Альцгеймера, кортикобазальную дегенерацию, прогрессирующий надъядерный паралич, Болезнь Пика, аргирофильную зернистую деменцию (аргирофильную зернистую болезнь), множественную системную таупатию с пресенильной деменцией (MSTD), лобно-височную деменцию и паркинсонизм, сцепленные с хромосомой 17 (FTDP-17), деменцию с нейрофибриллярными клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией (DNTC), таупатию белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI) или лобно-височную лобарную дегенерацию с патологией тау (FTLD-тау).

В дополнительном аспекте в изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие гуманизованное антитело или его фрагмент или производное, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнительном аспекте изобретение относится к антителам против pSer413 тау, содержащим: а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 86, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 88; и б) вариабельный домен легкой цепи, содержащий набор vlCDR, выбранный из группы, состоящей из: i) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 102, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83; ii) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 91, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83; iii) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 92, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83; iv) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 93, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83; v) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 94, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83; vi) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 95, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83; vii) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 96, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83; viii) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 97, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83; ix) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 98, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83; x) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 99, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83; xi) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 100, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83; и xii) vlCDR1, содержащей SEQ ID NO: 101, vlCDR2, содержащей SEQ ID NO: 82, и vlCDR3, содержащей SEQ ID NO: 83. В некоторых случаях антитело имеет отношение связывания антитела с фосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 8 к связыванию антитела с нефосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 69, равное по меньшей мере около 40.

В дополнительных аспектах изобретение относится к антителам против pSer413 тау, содержащим: а) вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 117; и б) вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113 и SEQ ID NO: 114. В некоторых случаях антитело имеет отношение связывания антитела с фосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 8 к связыванию антитела с нефосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 69, равное по меньшей мере около 40.

В дополнительном аспекте антитела по изобретению содержат константный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 и SEQ ID NO: 144.

В дополнительном аспекте антитела по изобретению содержат константный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 80.

В дополнительном аспекте антитела по изобретению содержат константный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 117.

В дополнительном аспекте антитела по изобретению содержат вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ

ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113 и SEQ ID NO: 114.

В дополнительном аспекте антитела содержат тяжелые и легкие цепи, выбранные из пар LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 144; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 145; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 146; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 147; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 148; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 149; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 150; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 151; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 152; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 153; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 154; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 155; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 156; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 157; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 158; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 159; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 160; LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 161; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 144; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 145; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 146; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 147; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 148; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 149; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 150; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 151; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 152; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 153; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 154; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 155; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 156; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 157; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 158; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 159; LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 160 и LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 161.

В дополнительном аспекте антитело по изобретению имеет легкую цепь, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 184, и тяжелую цепь, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 144.

В дополнительном аспекте антитело по изобретению имеет легкую цепь, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 184, и тяжелую цепь, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 152.

В дополнительном аспекте изобретение относится к композициям нуклеиновых кислот, содержащим: а) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь, выбранную из SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184 и SEQ ID NO: 185; и б) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь, выбранную из SEQ ID NO: 144; SEQ ID NO: 145; SEQ ID NO: 146; SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 148; SEQ ID NO: 149; SEQ ID NO: 150; SEQ ID NO: 151; SEQ ID NO: 152; SEQ ID NO: 153; SEQ ID NO: 154; SEQ ID NO: 155; SEQ ID NO: 156; SEQ ID NO: 157; SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 159; SEQ ID NO: 160 и SEQ ID NO: 161.

В дополнительном аспекте изобретение относится к композициям вектора экспрессии, содержащим первую и вторую нуклеиновую кислоту, причем первая нуклеиновая кислота содержится в первом векторе экспрессии, а вторая нуклеиновая кислота содержится во втором векторе экспрессии.

В дополнительном аспекте изобретение относится к композиции вектора экспрессии, в которой первая нуклеиновая кислота и вторая нуклеиновая кислота содержатся в одном векторе экспрессии.

В дополнительном аспекте изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим композицию вектора экспрессии, и способам получения антитела против pSer413 тау, включающим культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых указанное антитело экспрессируется, и выделение указанного антитела.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способам лечения таупатии у субъекта, включающим введение антител по изобретению.

Краткое описание графических материалов

Изобретение может быть лучше понято из следующего подробного описания при прочтении вместе с прилагаемыми графическими материалами. В графические материалы включены следующие фигуры:

Фиг. 1А и фиг. 1В вместе демонстрируют выравнивание различных изоформ тау-белка человека, полученное с помощью ClustalW.

Фиг. 2А демонстрирует выравнивание последовательностей переменной области легкой цепи с выделением последовательностей CDR11, CDR-L2 и CDR-L3 в соответствии с системой нумерации Rabat для нескольких связывающих белков против pS413-тау в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 2В демонстрирует выравнивание последовательностей переменной области тяжелой цепи с выделением последовательностей CDRH1, CDR-H2 и CDR-H3 в соответствии с системой нумерации Rabat для нескольких связывающих белков против pS413-тау в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 3 иллюстрирует аффинность селективного связывания нескольких антител против pS413-тау к фосфорилированному пептиду PD17P относительно нефосфорилированного пептида PD17 в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 4 иллюстрирует аффинность связывания нескольких антител против pS413-тау к фосфорилированному тау в гомогенате ткани головного мозга от пациента с болезнью Альцгеймера в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

Фиг. 5А и фиг. 5В демонстрируют фармакокинетику вариантов гуманизированных антител в плазме мыши в течение времени. Фиг. 5А демонстрирует, что пять исходных вариантов гуманизированных антител 2, 5, 6, 9 и 10 продемонстрировали быстрое выведение из плазмы мыши. Фиг. 5В демонстрирует, что три позже разработанных варианта гуманизированных антител L15H11, L4 6H11 и L4 7H65 продемонстрировали профили фармакокинетики, сопоставимые с химерными антителами.

Фиг. 6А и фиг. 6В демонстрируют, что различные варианты гуманизированных антител характеризуются разной интрацеребральной миграцией. Фиг. 6А демонстрирует концентрацию различных гуманизированных антител в гомогенате ткани головного мозга. Фиг. 6В демонстрирует отношение уровня репрезентативных гуманизированных антител в головном мозге к уровню соответствующих антител в плазме.

Фиг. 7А и фиг. 7В представляют выравнивание аминокислотных последовательностей вариabельной области легкой цепи (фиг. 7А) и вариabельной области тяжелой цепи (фиг. 7В) репрезентативных вариантов гуманизированных антител с родительским антителом мыши.

Фиг. 8А-8D демонстрируют, что родительское антитело мыши (фиг. 8А и 8В) и химерное антитело (фиг. 8С и 8D) связываются с фосфорилированным пептидом (фиг. 8А и 8С), но не с нефосфорилированным аналогом (фиг. 8В и 8D).

Фиг. 9А-9С демонстрируют связывание репрезентативных вариантов гуманизированных антител с пептидом pS413.

Фиг. 10А-10Е демонстрируют сравнимые характеристики связывания родительского антитела мыши (фиг. 10А), химерного антитела (фиг. 10В) и выбранных вариантов гуманизированных антител (фиг. 10С-10Е) с S413-фосфорилированным тау-белком в гомогенатах ткани головного мозга от пациентов с болезнью Альцгеймера.

Фиг. 11А-11Е демонстрируют вариabельные области тяжелых цепей и вариabельные области легких цепей некоторых из гуманизированных антител против pSer413-тау-белка по изобретению.

Фиг. 12 демонстрирует ряд различных константных доменов IgG человека, которые находят применение в комбинациях вариabельных доменов тяжелых цепей и вариabельных доменов легких цепей антител против pSer413 тау. "Human_IgG1_" представляет собой константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG1 дикого типа. "Human_IgG1_L2 34A_L2 35A" представляет собой константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG1 дикого типа с двумя аминокислотными заменами, L234А и L235А (иногда называемыми мутациями "LALA"), которые снижают/устраняют эффекторную функцию. "Human_IgG1_L234A_L235A_D265S" представляет собой константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG1 дикого типа с тремя аминокислотными заменами, L234А, L235А и D265S, которые снижают/устраняют эффекторную функцию. "Human_IgG1_YTE_" или "Human_IgG1_YTE (M252Y_S254T_T256E)" представляет собой константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG1 дикого типа с тремя аминокислотными заменами, M252Y, S254T, T256E, которые увеличивают период полужизни антител в сыворотке.

"Human_IgG_N297A_" представляет собой константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG1 дикого типа с аминокислотной заменой N297А, которая устраняет сайт гликозилирования и снижает/устраняет эффекторную функцию. "Human_IgG1_N297Q_" представляет собой константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG1 дикого типа с аминокислотной заменой N297Q, которая устраняет сайт гликозилирования и снижает/устраняет эффекторную функцию. "_Human_IgG2" представляет собой константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG2 дикого типа. "_Human_IgG4" представляет собой константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG4 дикого типа.

"Human_IgG4_S228P_" представляет собой константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG4 дикого типа с аминокислотной заменой S228P для предотвращения обмена плечами.

Фиг. 13 демонстрирует полноразмерные тяжелые цепи для вариabельных областей H11 и H65 в сочетании с каркасами с фиг. 12. "Косая" ("/") указывает на соединение вариabельного и константного доменов, а CDR подчеркнуты.

Фиг. 14 демонстрирует полноразмерные легкие цепи для 12 различных вариabельных доменов легкой цепи с константными доменами легкой цепи каппа или лямбда человека. "Косая" ("/") указывает на соединение вариabельного и константного доменов, а CDR подчеркнуты.

Фиг. 15 изображает матрицу возможных комбинаций тяжелых и легких цепей по изобретению. "А" в поле указывает, что используется константный домен тяжелой цепи "Human_IgG1_". "В" в поле указывает, что используется константный домен тяжелой цепи "Human_IgG1_L234A_L235A". "С" в поле указывает, что используется константный домен тяжелой цепи "Human_IgG1_L234A_L235A_D265S". "D" в поле означает, что используется константный домен тяжелой цепи "Human_IgG1_YTE_". "Е" в поле означает, что используется константный домен тяжелой цепи "Human_IgG1_N297A_". "F" в поле означает, что используется константный домен тяжелой цепи "Human_IgG1_N297Q_". "G" в поле означает, что используется константный домен тяжелой цепи "_Human_IgG2". "H" в поле означает, что используется константный домен тяжелой цепи "_Human_IgG4". "I" в поле означает, что используется константный домен тяжелой цепи "Human_IgG4_S228P_". "J" в поле означает, что используется константный домен

IgG1 человека с от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными заменами.

Подробное описание сущности изобретения

Обзор.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые содержат антигенсвязывающую часть, которая специфически связывается с тау-белком, который является фосфорилированным по остатку серина 413 (pSer413-тау). Также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие белки, и клетки, которые содержат такие нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы и композиции используются для лечения таупатий (например, болезни Альцгеймера).

Ген МАРТ, кодирующий тау, был идентифицирован как состоящий из 13 экзонов, расположенных в геноме, которые могут экспрессироваться в виде множества различных изоформ белка посредством альтернативного сплайсинга (см. Aga1, выше). Тау-белок содержит N-концевой кислотный домен, содержащий 0-2 повторяющихся последовательности (N) из 29 аминокислот в зависимости от альтернативного сплайсинга экзона 2 и экзона 3 (N0-N2), промежуточный домен, богатый пролином, и C-концевой домен, связывающий микротрубочки (кодируемый экзонами 9-12), содержащий 3 (3R) или 4 (4R) повторяющихся последовательности (R), которые способствуют связыванию микротрубочек (Burns, выше и Aga1, выше). Следовательно, тау человека имеет шесть типичных изоформ: 3R0N (352 аминокислоты), 3R1N (381 аминокислота), 3R2N (410 аминокислот), 4R0N (383 аминокислоты), 4R1N (412 аминокислот) и 4R2N (441 аминокислота), в зависимости от количества 29-аминокислотных повторяющихся последовательностей (N) и связывающих микротрубочки повторяющихся последовательностей (R), которые он содержит. Из этих изоформ только 3R0N присутствует в эмбриональном мозге, тогда как все шесть изоформ присутствуют в мозге взрослого человека, причем 4R является наиболее распространенной (Burns, выше). Разница между изоформами 3R и 4R обусловлена тем, удален ли экзон 10 посредством альтернативного сплайсинга (3R) или присутствует (4R). Чтобы однозначно идентифицировать положение аминокислотного остатка в любой из этих изоформ тау, номера аминокислот (от 1 до 441) самой длинной изоформы, т.е. 4R2N (определенной в SEQ ID NO: 1), используются в качестве референса. Например, "Ser413" относится к остатку серина в аминокислотном положении 413 в 4R2N (определенной в SEQ ID NO: 1), что соответствует серину в положении 384 в 4R1N (определенной в SEQ ID NO: 2), в положении 355 в 4R0N (определенной в SEQ ID NO: 3), в положении 382 в 3R2N (определяется в SEQ ID NO: 4), в положении 353 в 3R1N (определенной в SEQ ID NO: 5) и в положении 324 в 3R0N (определенной в SEQ ID NO: 6).

Тау имеет фосфорилированный аминокислотный остаток в положении, соответствующем остатку серина в положении 413 (Ser413 при фосфорилировании называется в данном документе "pSer413") аминокислотной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1 (и, таким образом, тау-белок, фосфорилированный по Ser413, представляет собой "pSer413 тау" или "pSer413-Тау"), который является сайтом, специфически фосфорилированным при БА. Как показано ранее в WO 2013/180238, введение антител, которые участвуют в специфических реакциях антиген-антитело с PSer413-тау, трансгенным мышам, у которых при созревании развивается нарушение когнитивной функции, приводило к восстановлению когнитивных функций почти до того же уровня, что и у контрольной группы. Интересно, что введение такой же концентрации моноклонального антитела против тау-белка, имеющего фосфорилированный аминокислотный остаток в положении, соответствующем Ser396 аминокислотной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1, которое имеет большую аффинность к эквивалентному антигену, чем вышеуказанное антитело, не приводило к достаточному улучшению когнитивных функций. Поскольку не было конкретной информации об области, включающей аминокислотный остаток в положении, соответствующем Ser413 аминокислотной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1, в отношении структуры и функций тау, это был совершенно неожиданный результат, что антитело, которое связывается с этой областью, имело такой сильный эффект улучшения когнитивной функции.

Соответственно, данное изобретение направлено на гуманизированные и оптимизированные антитела против pSer413-тау, пригодные в качестве терапевтического или профилактического агента для лечения когнитивных расстройств, таких как таупатия, у субъекта-человека.

Гуманизированное антитело против фосфорилированного тау по данному изобретению проявляет высокую аффинность связывания с фосфорилированным тау, в то же время имея значительно сниженную антигенность для организма человека, и может эффективно применяться в качестве терапевтического или профилактического агента при когнитивных расстройствах, таких как таупатия, у субъекта-человека. Кроме того, модификации аминокислот в CDR по сравнению с мышиными CDR снижают дезаминацию, приводя к повышенной стабильности; см. примеры 8, 9 и 10.

Определения.

В контексте данного документа каждый из следующих терминов имеет значение, приписываемое ему в этом разделе.

В контексте данного документа форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. В качестве примера "элемент" означает один элемент или более одного элемента.

В контексте данного документа подразумевается, что термин "около", используемый в отношении измеряемого значения, такого как количество, временная длительность и т.п., включает вариации $\pm 20\%$

или $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 1\%$, и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ от указанного значения, так как такие вариации являются подходящими для осуществления раскрытых способов.

Под "абляцией" в данном документе подразумевается снижение или устранение активности. Таким образом, например, "абляция связывания Fc γ R" означает, что аминокислотный вариант Fc-области характеризуется менее чем 50% начального связывания по сравнению с Fc-областью, не содержащей конкретный вариант, при этом предпочтительной является потеря 70-80-90-95-98% активности, и, в общем случае, активность находится ниже уровня выявляемого связывания в анализе Вiasoge.

Термин "АЗКЦ" или "антитело-зависимая клеточноопосредованная цитотоксичность" в контексте данного документа означает клеточно-опосредованную реакцию, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc γ R, распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени. АЗКЦ коррелирует со связыванием с Fc γ RIIIa; повышение связывания с Fc γ RIIIa приводит к повышению активности АЗКЦ. Как обсуждается в данном документе, многие варианты осуществления изобретения полностью устраняют активность АЗКЦ.

Термин "АЗКФ" или антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз в контексте данного документа означает клеточно-опосредованную реакцию, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc γ R, распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают фагоцитоз клетки-мишени.

Под "антигенсвязывающим доменом" или "АСД" в данном документе подразумевается набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR, от англ. "Complementary Determining Regions"), которые, являясь частью полипептидной последовательности, специфически связывают целевой антиген, как обсуждается в данном документе. Таким образом, "антигенсвязывающий домен" связывает целевой антиген, как описано в данном документе. Как известно в данной области техники, эти CDR обычно присутствуют в виде первого набора CDR варибельного домена тяжелой цепи (vhCDRs или V_HCDR или CDR-НС) и второго набора CDR варибельного домена легкой цепи (vlCDR или V_LCDR или CDR-LC), каждый из которых содержит три CDR: vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3 для тяжелой цепи и vlCDR1, vlCDR2 и vlCDR3 для легкой цепи. CDR присутствуют в варибельных доменах тяжелой цепи и варибельных доменах легкой цепи, соответственно, и вместе образуют Fv-область. Таким образом, в некоторых случаях шесть CDR антигенсвязывающего домена представлены варибельным доменом тяжелой и варибельным доменом легкой цепи. В формате "Fab" набор из 6 CDR представлен двумя различными полипептидными последовательностями, варибельным доменом тяжелой цепи (vh или V_H; содержащим vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3) и варибельным доменом легкой цепи (vl или V_L; содержащим vlCDR1, vlCDR2 и vlCDR3), с С-концом домена vh, присоединенным к N-концу домена CH1 тяжелой цепи, и С-концом домена vl, присоединенным к N-концу константного домена легкой цепи (и, таким образом, образующим легкую цепь). В формате scFv домены vh и vl ковалентно соединяются, как правило, посредством использования линкера, как указано в данном документе, в одну полипептидную последовательность, которая может представлять собой (начиная с N-конца) vh-линкер-vl или vl-линкер-vh, причем первый вариант обычно является предпочтительным (включая необязательные доменные линкеры на каждой стороне, в зависимости от используемого формата). Как известно в данной области техники, CDR разделены каркасными областями в каждом из варибельных доменов тяжелой цепи и варибельных доменов легкой цепи: FR1-vlCDR1-FR2-vlCDR2-FR3-vlCDR3-FR4, и для варибельного домена тяжелой цепи они представляют собой FR1-vhCDR1-FR2-vhCDR2-FR3-vhCDR3-FR4, с каркасными областями, демонстрирующими высокую идентичность с последовательностями зародышевой линии человека. Антигенсвязывающие домены по изобретению включают Fab, Fv и scFv.

Под "модификацией" в данном документе подразумевается аминокислотная замена, вставка и/или делеция в полипептидной последовательности или изменение фрагмента, химически связанного с белком. Например, модификация может представлять собой измененную или ПЭГ-структуру, присоединенную к белку. Под "аминокислотной модификацией" в данном документе подразумевается аминокислотная замена, вставка и/или делеция в полипептидной последовательности. Для ясности, если не указано иное, модификация аминокислоты всегда относится к аминокислоте, кодируемой ДНК, например, к 20 аминокислотам, которые имеют кодоны в ДНК и РНК.

Под "аминокислотной заменой" или "заменой" в данном документе подразумевается замена аминокислоты в конкретном положении в родительской полипептидной последовательности другой аминокислотой. В частности, в некоторых вариантах осуществления замена представляет собой аминокислоту, которая не встречается в природе в конкретном положении, либо не встречается в природе в указанном организме или в любом организме. Например, замена M252Y относится к варианту полипептида, в данном случае к Fc-варианту, в котором метионин в положении 252 заменен тирозином. Для ясности, белок, который был сконструирован с изменением кодирующей нуклеотидной последовательности, но не с изменением исходной аминокислоты (например, замена CGG (кодирующего аргинин) на CGA (также кодирующий аргинин), для повышения уровней экспрессии в организме хозяина), не является "аминокислотной заменой"; т.е. несмотря на создание нового гена, кодирующего такой же белок, если белок имеет

такую же аминокислоту в указанной конкретной позиции, которая была в нем изначально, это не является аминокислотной заменой.

В контексте данного документа под термином "вариантный белок" или "вариант белка", или "вариант" подразумевается белок, который отличается от родительского белка за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации. Вариант белка может относиться к самому белку, композиции, содержащей белок, или к аминокислотной последовательности, которая его кодирует. Предпочтительно, вариант белка имеет по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с родительским белком, например, от около одной до около семидесяти аминокислотных модификаций, и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных модификаций по сравнению с родительским белком. Как описано ниже, в некоторых вариантах осуществления родительский полипептид, например, родительский полипептид Fc, представляет собой человеческую последовательность дикого типа, такую как Fc-области из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Вариант последовательности белка в данном документе предпочтительно будет обладать по меньшей мере около 80% идентичности с последовательностью родительского белка и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере около 90% идентичности, более предпочтительно, по меньшей мере около 95%-98%-99% идентичности. Вариант белка может относиться к самому варианту белка, композициям, содержащим вариант белка, или последовательности ДНК, которая его кодирует.

Соответственно, в контексте данного документа под "вариантом антитела" или "вариантным антителом" подразумевается антитело, которое отличается от родительского антитела за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации, в контексте данного документа под "вариантом IgG" или "вариантным IgG" подразумевается антитело, которое отличается от родительского IgG (опять же, во многих случаях от последовательности IgG человека) за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации, и в контексте данного документа под "вариантом иммуноглобулина" или "вариантным иммуноглобулином" подразумевается последовательность иммуноглобулина, которая отличается от последовательности родительского иммуноглобулина за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации. В контексте данного документа под "вариантом Fc" или "вариантным Fc" подразумевается белок, содержащий аминокислотную модификацию в Fc-домене. Fc-варианты по данному изобретению определены в соответствии с аминокислотными модификациями, которые их составляют. Таким образом, например, M252Y или 252Y представляет собой Fc-вариант с заменой тирозина в положении 252 относительно родительского Fc-полипептида, в котором нумерация соответствует индексу EU. Аналогично, M252Y/S254T/T256E определяет Fc-вариант с заменами M252Y, S254T и T256E относительно родительского Fc-полипептида. Идентичность аминокислоты ДТ (дикого типа) может быть неопределенной, и в этом случае вышеупомянутый вариант обозначается как 252Y/254T/256E. Следует отметить, что порядок, в котором приведены замены, является произвольным, т.е., например, 252Y/254T/256E является тем же Fc-вариантом, что и 254T/252Y/256E, и так далее. Для всех положений, обсуждаемых в данном изобретении, которые относятся к антителам, если не указано иное, нумерация аминокислотных положений соответствует Rabat для нумерации переменных доменов и соответствует индексу EU для константных доменов, включая Fc-домен. Индекс EU или EU-индекс в схеме нумерации Rabat или EU относится к нумерации антител EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85, полностью включенная в данный документ посредством ссылки.)

Модификация может представлять собой добавление, делецию или замену. Замены могут включать аминокислоты природного происхождения и, в некоторых случаях, синтетические аминокислоты.

В контексте данного документа термин "белок" означает по меньшей мере две ковалентно связанные аминокислоты, что включает белки, полипептиды, олигопептиды и пептиды. Пептидная группа может содержать аминокислоты природного происхождения и пептидные связи.

В контексте данного документа под "Fab" или "областью Fab" подразумевается полипептид, который содержит домены VH, CH1, VL и CL иммуноглобулина. Fab может относиться к этой области отдельно или к этой области в контексте полноразмерного антитела, фрагмента антитела или слитого белка Fab.

В контексте данного документа термин "Fv", "фрагмент Fv" или "область Fv" означает полипептид, который содержит домены VL и VH одного антигенсвязывающего домена (АСД). Как будет понятно специалистам в данной области техники, они, как правило, состоят из двух цепей или могут быть объединены (обычно с помощью линкера, как обсуждается в данном документе) для образования scFv.

В контексте данного документа термины "аминокислота" и "идентичность аминокислоты" означают одну из 20 аминокислот природного происхождения, которые кодируются ДНК и РНК.

Под "эффektorной функцией" в контексте данного документа подразумевается биохимическое событие, которое возникает в результате взаимодействия Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом. Эффektorные функции включают, но не ограничиваются, АЦЗК, АЗКФ и КЗЦ.

Под "Fc-гамма-рецептором", "FcγR" или "FcγR" в контексте данного документа подразумевается любой член семейства белков, который связывает Fc-область антитела IgG и кодируется геном FcγR. У людей это семейство включает, без ограничения, FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIa, FcγRIb, и

FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 и R131), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2), и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65, полностью включено посредством ссылки), а также любые неизвестные FcγR или изоформы или аллотипы FcγR человека. В некоторых случаях, как указано в данном документе, связывание с одним или более рецепторами FcγR снижается или устраняется. Например, уменьшение связывания с FcγRIIIa снижает АЗКЦ, а в некоторых случаях желательное уменьшение связывания с FcγRIIIa и FcγRIIb.

В контексте данного документа термин "FcRn" или "неонатальный Fc-рецептор" означает белок, который связывает Fc-область антитела IgG и кодируется, по меньшей мере частично, геном FcRn. FcRn может быть из любого организма, включая, но не ограничиваясь этим, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Как известно в данной области техники, функциональный белок FcRn содержит два полипептида, которые часто называют тяжелой цепью и легкой цепью. Легкая цепь представляет собой бета-2-микроглобулин, а тяжелая цепь кодируется геном FcRn. Если в данном документе не указано иное, FcRn или белок FcRn относится к комплексу тяжелой цепи FcRn с бета-2-микроглобулином.

В контексте данного документа под "родительским полипептидом" подразумевается исходный полипептид, который впоследствии модифицируют для получения варианта. Родительский полипептид может представлять собой полипептид природного происхождения или вариант, или сконструированную версию полипептида природного происхождения. Родительский полипептид может относиться к самому полипептиду, композициям, которые содержат родительский полипептид, или к аминокислотной последовательности, которая его кодирует. Соответственно, в контексте данного документа "родительский иммуноглобулин" означает немодифицированный полипептид иммуноглобулина, который модифицирован для получения варианта, а "родительское антитело" в контексте данного документа означает немодифицированное антитело, которое модифицировано для получения варианта антитела. Следует отметить, что "родительское антитело" включает известные коммерческие, рекомбинантно продуцируемые антитела, как описано ниже.

Под "константной областью тяжелой цепи" в данном документе подразумевается часть CH1-шарнир-CH2-CH3 антитела, как правило, из IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

В контексте данного документа термин "антиген-мишень" означает молекулу, которая специфически связана с вариабельной областью данного антитела. В данном случае антиген-мишень представляет собой тау-белок, фосфорилированный в положении Ser413 ("pSer413-Tau").

В контексте данного документа под "клеткой-мишенью" подразумевается клетка, которая экспрессирует антиген-мишень.

Под "вариабельной областью" в контексте данного документа подразумевается область иммуноглобулина, которая содержит один или более Ig-доменов, по существу кодируемых любым из генов V.kappa., V.lamda. и/или VH, которые составляют генетические локусы каппа, лямбда и тяжелой цепи иммуноглобулинов соответственно.

Под "диким типом или ДТ" в данном документе подразумевается аминокислотная последовательность или нуклеотидная последовательность, которая встречается в природе, включая аллельные вариации. Белок ДТ имеет аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, которая не была намеренно модифицирована.

В контексте данного документа термин "тау-белок" означает любую из шести изоформ тау-белка человека, имеющих аминокислотные последовательности, определенные в SEQ ID NO: 1-6, т. е. 4R2N (определена в SEQ ID NO: 1), 4R1N (определена в SEQ ID NO: 2), 4R0N (определена в SEQ ID NO: 3), 3R2N (определена в SEQ ID NO: 4), 3R1N (определена в SEQ ID NO: 5) и 3R0N (определена в SEQ ID NO: 6), а также их генные варианты. Как объяснено в разделе "УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ", выше, с FTDP-17, которое является наследственным нейродегенеративным заболеванием, связанным с когнитивными расстройствами, было связано более 40 мутаций. Однако сайты мутаций в тау-белке не должны ограничиваться участками, связанными с FTDP-17. Число аминокислотных мутаций, введенных в аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-6, не должно быть ограничено, но может составлять от 1 до 50, в частности от 1 до 30, более конкретно от 1 до 10. Однако аминокислотный остаток, соответствующий аминокислотной последовательности, определенной в остатке серина в положении 413 SEQ ID NO: 1 (Ser413), предпочтительно должен быть сохранен. Тау-белок согласно данному изобретению также включает белки, имеющие сходство или идентичность, составляющие 80% или более, с аминокислотной последовательностью тау-белка человека, определенной в SEQ ID NO: 1 в соответствии с методом BLAST (с условиями PBLAST по умолчанию, предоставленными NCBI), и их изоформы. Такие тау-белки включают тау, полученные от видов, отличных от человека, таких как шимпанзе, макаки, лошади, свиньи, собаки, мыши, кролики и крысы. Можно получить терапевтический или профилактический агент, нацеленный на тау, полученный от такого отличного от человека животного, с целью улучшения когнитивной функции целевого животного.

В контексте данного документа термин "тау-пептид" означает пептид, содержащий часть аминокислотной последовательности тау-белка. Положение и длина аминокислотной последовательности тау-

пептида, полученной из белка тау, не должны быть ограничены, но предпочтительно должны содержать, например, серию из, по меньшей мере, трех последовательных аминокислот, в частности, по меньшей мере, пяти последовательных аминокислот, более конкретно, по меньшей мере, восьми последовательных аминокислот, полученных из аминокислотных остатков, соответствующих номерам аминокислот с 410 по 421 SEQ ID NO: 1, по меньшей мере, включая аминокислоту, соответствующую Ser413. Длина тау-пептида также не должна быть ограничена, но предпочтительно должна иметь длину в четыре или более аминокислот, в частности шесть или более, более конкретно восемь или более.

Используемый в данном документе термин "тау" в целом означает тау-белок или тау-пептид.

Термин "белок против pSer413-тау" означает антитело, описанное в данном документе, которое предпочтительно связывается с тау-белком, фосфорилированным по серину в положении 413, по сравнению со связыванием тау-белка, не фосфорилированного по серину в положении 413. Белок тау, фосфорилированный по Ser413, может быть человеческим и/или мышинным.

В контексте данного документа под "положением" подразумевается местоположение в последовательности белка. Положения могут быть пронумерованы последовательно или в соответствии с установленным форматом, например, индексом EU для нумерации антител.

В контексте данного документа под "остатком" подразумевается положение в белке и связанная с ним аминокислотная идентичность. Например, аспарагин 297 (также называемый Asn297 или N297) представляет собой остаток в положении 297 антитела IgG1 человека.

В контексте данного изобретения положение аминокислотного остатка в тау-белке или тау-пептиде указывается посредством номера аминокислоты, который определяется на основе аминокислотной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1, в целях ясности. Например, аминокислотный остаток, соответствующий Ser413 SEQ ID NO: 1, означает остаток серина в положении 413 SEQ ID NO: 1 (4R2N), положении 384 SEQ ID NO: 2 (4R1N), положении 355 SEQ ID NO: 3 (4R0N), положении 382 SEQ ID NO: 4 (3R2N), положении 353 SEQ ID NO: 5 (3R1N) или положении 324 SEQ ID NO: 6 (3R0N). Соответствие положений аминокислотных остатков между изоформами тау показано в табл. 1.1 ниже.

Таблица 1.1

Изоформы тау-белка человека

Изоформа	4R2N	4R1N	4R0N	3R2N	3R1N	3R0N
Последовательность	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
Аминокислотный остаток	Аминокислотный номер					
Asn	410	381	352	379	350	321
Val	411	382	353	380	351	322
Ser	412	383	354	381	352	323
Ser	413	384	355	382	353	324
Thr	414	385	356	383	354	325
Gly	415	386	357	384	355	326
Ser	416	387	358	385	356	327
Ile	417	388	359	386	357	328
Asp	418	389	360	387	358	329
Met	419	390	361	388	359	330
Val	420	391	362	389	360	331
Asp	421	392	363	390	361	332

Хотя в табл. 1 показаны положения аминокислотных остатков этих изоформ, соответствующие положениям с 410 по 421 аминокислотной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1, соответствие положений аминокислотных остатков в других областях можно легко понять на основании, например, фиг. 1A и 1B. Специалист в данной области техники сможет определить соответствующие положения аминокислот в изоформах или гомологах, используя попарное выравнивание последовательностей, такое как метод Нидлмана-Вунша или метод Смита-Уотермана, или множественное выравнивание последовательностей, такое как метод ClustalW или метод PRRP. В качестве примера анализа соответствующих положений на фиг. 1A и 1B показано выравнивание аминокислотных последовательностей шести изоформ человека (с обозначением однобуквенным кодом) на основе ClustalW. Эти фигуры указывают, что структура вокруг аминокислотного остатка, соответствующего Ser413 аминокислотной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1, является консервативной среди шести изоформ.

Антитела по данному изобретению обычно являются выделенными или рекомбинантными. Термин "выделенный", используемый для описания различных полипептидов, описанных в данном документе,

означает полипептид, который был идентифицирован и отделен и/или извлечен из клетки или клеточной культуры, из которой он был экспрессирован. Обычно, выделенный полипептид получают с помощью по меньшей мере одного этапа очистки. "Выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, имеющих различные антигенные специфичности. "Рекомбинантный" означает, что антитела созданы с использованием технологий рекомбинантных нуклеиновых кислот в экзогенных клетках-хозяевах.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" в отношении последовательности белка определяется как процент аминокислотных остатков в кандидатской последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной (родительской) последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения наибольшего процента идентичности последовательности и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть выполнено различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить нужные параметры для выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Одной конкретной программой является программа ALIGN-2, описанная в пунктах [0279]-[0280] публикации США № 20160244525, включенной в данный документ посредством ссылки. Другое приблизительное выравнивание для последовательностей нуклеиновых кислот обеспечивается алгоритмом локальной гомологии Смита и Уотермана, Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 2:482-489 (1981). Этот алгоритм может быть применен к аминокислотным последовательностям с использованием оценочной матрицы, разработанной Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, и нормализованной Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14 (6):6745-6763 (1986).

Пример реализации этого алгоритма для определения процента идентичности последовательности предоставлен Genetics Computer Group (Мэдисон, Висконсин) в служебном приложении "BestFit". Параметры по умолчанию для этого метода описаны в Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, версия 8 (1995) (доступная от Genetics Computer Group, Мэдиссон, штат Висконсин). Другой способ установления процента идентичности в контексте данного изобретения заключается в использовании пакета программ MPSRCH, защищенного авторским правом Эдинбургского университета, разработанного Джоном Ф. Коллинзом и Шейном С. Стурроком и распространяемого IntelliGenetics, Inc. (Маунтин Вью, штат Калифорния). Из этого набора пакетов может быть использован алгоритм Смита-Уотермана, если для оценочной таблицы используются параметры по умолчанию (например, штраф за открытие гэпа, равный 12, штраф за продление гэпа, равный одному и гэп, равный шести). Из сгенерированных данных значение "соответствие" (англ. - "Match") отражает "идентичность последовательности". Другие подходящие программы для вычисления процента идентичности или сходства между последовательностями в целом известны в данной области техники, например, другой программой выравнивания является BLAST, используемая с параметрами по умолчанию. Например, BLASTN и BLASTP могут использоваться с использованием следующих параметров по умолчанию: генетический код=стандарт; фильтр=отсутствует; цепь=обе; отсечение=60; ожидание=10; матрица=BLOSUM62; описания=50 последовательностей; сортировать по=ВЫСШИЙ БАЛЛ; Базы данных=неопределенная, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+переводы GenBank CDS+Swiss protein+Spupdate+PIR. Подробную информацию об этих программах можно найти по адресу в интернете, поставив [http://](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) перед blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

Степень идентичности между аминокислотной последовательностью по данному изобретению ("последовательностью изобретения") и родительской аминокислотной последовательностью рассчитывают как число точных совпадений в выравнивании двух последовательностей, деленное на длину последовательности "изобретения", или длину родительской последовательности, в зависимости от того, что является самым коротким. Результат выражают в процентах идентичности.

В некоторых вариантах осуществления две или более аминокислотных последовательностей имеют по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80% или 90% идентичности. В некоторых вариантах осуществления две или более аминокислотных последовательностей имеют по меньшей мере 95%, 97%, 98%, 99% или даже 100% идентичности.

"Специфическое связывание" или "специфически связывается" или "специфический в отношении" конкретного антигена или эпитопа означает связывание, которое заметно отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание может быть измерено, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу сходной структуры, которая не обладает активностью связывания. Например, специфическое связывание может быть определено путем конкуренции с контрольной молекулой, сходной с мишенью.

Термин " K_{assoc} " или " K_a " в контексте данного документа относится к скорости ассоциации конкрет-

ного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин " K_{dis} " или " K_d " в контексте данного документа относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин " K_D " в контексте данного документа предназначен для обозначения константы диссоциации, получаемой из соотношения K_d к K_a (т.е. K_d/K_a) и выражается в молярной концентрации (М). Значения K_D для антител можно определить с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления способ определения K_D антитела заключается в использовании поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием биосенсорной системы, такой как система BIACORE®. В определенных вариантах осуществления значение K_D измеряют с фосфорилированным тау-белком. В некоторых вариантах осуществления значение K_D измеряют с фосфорилированным пептидом. В некоторых вариантах осуществления значение K_D измеряют с иммобилизованным антигеном (например, фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным пептидом). В других вариантах осуществления значение K_D измеряют с иммобилизованным антителом (например, родительским антителом мыши, химерным антителом или вариантами гуманизированного антитела). В других вариантах осуществления значение K_D измеряют с фосфорилированным тау-белком в качестве аналита. В других вариантах осуществления значение K_D измеряют с фосфорилированным пептидом в качестве аналита. В определенных вариантах осуществления значение K_D измеряют в режиме двухвалентного связывания. В других вариантах осуществления значение K_D измеряют в режиме одновалентного связывания.

"Заболевание" включает состояние здоровья животного, включая человека, при котором животное не может поддерживать гомеостаз, и если заболевание не улучшается, то здоровье животного продолжает ухудшаться.

Напротив, "расстройство" у животного, включая человека, включает состояние здоровья, при котором животное способно поддерживать гомеостаз, но состояние здоровья животного менее благоприятное, чем оно было бы в отсутствие расстройства. При отсутствии лечения расстройство не обязательно приводит к дальнейшему ухудшению состояния здоровья животного.

Термины "лечение", "процесс лечения", "лечить" и тому подобное относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома или снижения вероятности заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного воздействия, связанного с заболеванием. В контексте данного документа термин "лечение" охватывает любое лечение заболевания у млекопитающих, в частности, у человека, и включает в себя: (а) предотвращение появления заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого это заболевание еще не диагностировано; (б) ингибирование заболевания, т.е. прекращение его развития или прогрессии; и (с) облегчение заболевания, т.е. регрессию заболевания и/или облегчение одного или более симптомов заболевания. "Лечение" также подразумевает доставку агента для обеспечения фармакологического эффекта даже в отсутствие заболевания или патологического состояния. Например, "лечение" включает доставку композиции, которая может вызывать иммунный ответ или придавать иммунитет, в отсутствие болезненного состояния, например, в случае вакцинации.

Используемый в данном документе термин "млекопитающее" относится к любому млекопитающему, включая, но не ограничиваясь этим, млекопитающих отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда Logomorpha, таких как кролики. В некоторых вариантах осуществления млекопитающие относятся к отряду Carnivora, включая кошачьих (кошки) и собачьих (собаки). В некоторых вариантах осуществления млекопитающие относятся к отряду Artiodactyla, включая крупный рогатый скот (коровы) и свиней (свиньи), или отряд Perssodactyla, включая лошадиных (лошади). Наиболее предпочтительно, чтобы млекопитающие были из отряда Primates, Ceboids или Simoids (обезьяны), или из отряда Anthropoids (люди и высшие приматы). В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека.

Используемый в данном документе термин "регрессия", а также его производные слова, не обязательно подразумевают 100% или полную регрессию. Скорее, существуют различные степени регрессии, которые специалисты в данной области техники расценивают как имеющие потенциальную пользу или терапевтический эффект. В этом отношении раскрытые способы могут обеспечить любое количество любого уровня регрессии таупатии у млекопитающего. Кроме того, регрессия, обеспечиваемая способом по изобретению, может включать регрессию одного или более патологических состояний или симптомов заболевания, например таупатии. Кроме того, в целях данного описания "регрессия" может включать задержку начала заболевания, задержку появления симптома и/или задержку начала патологического состояния. Что касается прогрессирующих заболеваний и расстройств, то "регрессия" может включать замедление прогрессирования заболевания или расстройства, замедление прогрессирования симптома заболевания или расстройства и/или замедление прогрессирования патологического состояния.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" композиции включает такое количество композиции, которое является достаточным для оказания благоприятного эффекта для субъекта, которому вводят композицию. "Эффективное количество" средства доставки включает это количество, достаточное для эффективного связывания или доставки композиции.

Под "индивидуумом", "хозяином", "субъектом" или "пациентом" подразумевается любой субъект-млекопитающее, для которого требуется диагностика, лечение или терапия, в особенности люди. Другие субъекты могут включать крупный рогатый скот, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей и так далее.

В контексте данного документа термин "в комбинации с" относится к применениям, в которых, например, первое лекарственное средство вводится в течение всего курса введения второго лекарственного средства; в которых первое лекарственное средство вводится в течение периода времени, который перекрывается с периодом введения второго лекарственного средства, например, когда введение первого лекарственного средства начинается до введения второго лекарственного средства и введение первого лекарственного средства заканчивается до завершения введения второго лекарственного средства; в которых введение второго лекарственного средства начинается до введения первого лекарственного средства и введение второго лекарственного средства заканчивается до завершения введения первого лекарственного средства; в которых введение первого лекарственного средства начинается до введения второго лекарственного средства, а введение второго лекарственного средства заканчивается до завершения введения первого лекарственного средства; в которых введение первого лекарственного средства начинается до введения второго лекарственного средства, а введение первого лекарственного средства заканчивается до завершения введения второго лекарственного средства. Соответственно, термин "в комбинации" также может относиться к режимам, предполагающим введение двух или более лекарственных средств. В контексте данного документа термин "в комбинации с" также относится к введению двух или более лекарственных средств, которые могут вводиться в одном или в разных составах, одинаковым или разными путями, а также в одинаковой или разной дозированной форме.

Термин "кодирующий" относится к характерному свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, предназначенном, чтобы служить в качестве матрицы для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющем определенную последовательность нуклеотидов (т.е. рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот, а также к биологическим свойствам, вытекающим из этого. Таким образом, ген кодирует белок, если, например, транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, приводит к выработке белка в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно предоставляется в перечнях последовательностей, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут рассматриваться как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Термин "нуклеиновая кислота" включает молекулы РНК или ДНК, имеющие более одного нуклеотида в любой форме, включая одноцепочечную, двухцепочечную, олигонуклеотид или полинуклеотид. Термин "нуклеотидная последовательность" включает упорядочение нуклеотидов в олигонуклеотиде или полинуклеотиде в одноцепочечной форме нуклеиновой кислоты.

Под "конструкцией нуклеиновой кислоты" подразумевается последовательность нуклеиновой кислоты, которая была сконструирована так, чтобы содержать одну или более функциональных единиц, не встречающихся вместе в природе. Примеры включают кольцевые, линейные, двухцепочечные молекулы внехромосомной ДНК (плазмиды), космиды (плазмиды, содержащие последовательности COS из фага лямбда), вирусные геномы, включая ненативные последовательности нуклеиновых кислот, и тому подобное.

Используемый в данном документе термин "функционально связанный" включает полинуклеотид, функционально связанный со вторым полинуклеотидом, например одноцепочечный или двухцепочечный фрагмент нуклеиновой кислоты, содержащий два полинуклеотида, расположенных внутри фрагмента нуклеиновой кислоты таким образом, что по меньшей мере один из двух полинуклеотидов способен оказывать физиологическое воздействие, которым он характеризуется, на другой. Например, промотор, функционально связанный с кодирующей областью гена, способен стимулировать транскрипцию кодирующей области. Порядок, определенный при указании функциональной связи, не важен. Например, фразы: "промотор функционально связан с нуклеотидной последовательностью" и "нуклеотидная последовательность функционально связана с промотором" используются в данном документе взаимозаменяемо и считаются эквивалентными. В некоторых случаях, когда нуклеиновая кислота, кодирующая желаемый белок, дополнительно содержит промотор/регуляторную последовательность, промотор/регуляторная последовательность располагается на 5'-конце желаемой кодирующей белок последовательности, так что она управляет экспрессией желаемого белка в клетке.

Термины "олигонуклеотид", "полинуклеотид" и "молекула нуклеиновой кислоты", взаимозаменяемо употребляемые в данном документе, относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, как рибонуклеотидов, так и дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, этот термин включает в себя, но не ограничивается этим, одно-, двух- или многоцепочечную ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания. Основная цепь полинуклеотида может содержать сахара и фосфатные группы (которые обычно могут быть найдены в РНК или ДНК) или модифицированные или замещенные сахарные или

фосфатные группы.

Термин "рекомбинантный" применительно к полинуклеотиду означает, что полинуклеотид является продуктом различных комбинаций этапов клонирования, рестрикции или лигирования и других процедур, приводящих к получению конструкции, отличной и/или отличающейся от полинуклеотида, обнаруживаемого в природе. Эти термины, соответственно, включают реплики исходной полинуклеотидной конструкции и потомство исходной вирусной конструкции.

Используемый в данном документе термин "промотор" включает последовательность ДНК, функционально связанную с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей транскрибированию, такой как последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая желаемую молекулу. Промотор обычно расположен выше последовательности нуклеиновой кислоты, подлежащей транскрибированию, и обеспечивает сайт для специфического связывания РНК-полимеразой и другими факторами транскрипции.

"Вектор" способен переносить последовательности генов в клетки-мишени. Как правило, "векторная конструкция", "вектор экспрессии" и "вектор переноса гена" означают любую конструкцию нуклеиновой кислоты, способную управлять экспрессией представляющего интерес гена и которая может переносить последовательности генов в клетки-мишени, что может быть достигнуто путем геномной интеграции всего или части вектора, или временного или наследуемого поддержания вектора как внехромосомного элемента. Таким образом, этот термин включает клонирующие и экспрессионные носители, а также интегрирующиеся векторы.

Используемый в данном документе термин "регуляторный элемент" включает нуклеотидную последовательность, которая контролирует некоторые аспекты экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот. Примеры регуляторных элементов в качестве иллюстрации включают энхансер, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), интрон, точку начала репликации, сигнал полиаденилирования (рА), промотор, энхансер, последовательность терминации транскрипции и вышележащий регуляторный домен, которые вносят вклад в репликацию, транскрипцию и/или посттранскрипционный процессинг последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях регуляторные элементы могут также включать цис-регуляторные элементы ДНК, а также подвижные элементы (ПЭ). Специалисты в данной области техники способны выбрать и использовать эти и другие регуляторные элементы в экспрессионной конструкции с помощью обычных экспериментов. Экспрессионные конструкции могут быть получены с использованием генетического рекомбинантного подхода или синтетически с использованием хорошо известной методологии.

"Контрольный элемент" или "контрольная последовательность" представляет собой нуклеотидную последовательность, участвующую во взаимодействии молекул, способствующих функциональной регуляции полинуклеотида, включая репликацию, дубликацию, транскрипцию, сплайсинг, трансляцию или деградацию полинуклеотида. Регулирование может влиять на частоту, скорость или специфичность процесса и может быть усиливающим или ингибирующим по своей природе. Контрольные элементы, известные в данной области техники, включают, например, регуляторные последовательности транскрипции, такие как промоторы и энхансеры. Промотор представляет собой область ДНК, способную в определенных условиях связывать РНК-полимеразу и инициировать транскрипцию кодирующей области, обычно расположенной ниже по ходу транскрипции (в направлении 3') от промотора.

В контексте данного документа утверждение о том, что аминокислотный остаток является "фосфорилированным", означает, что фосфатная группа связана сложноэфирной связью с боковой цепью аминокислотного остатка. Типичные аминокислотные остатки, которые могут быть фосфорилированы, включают серин (Ser), треонин (Thr) и тирозин (Tyr).

Антитела.

Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают тау-белок человека, который был фосфорилирован в положении 413.

Традиционные структурные единицы антитела обычно содержат тетрамер. Каждый тетрамер обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (обычно имеющую молекулярную массу около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (обычно имеющую молекулярную массу около 50-70 кДа). Легкие цепи человека классифицируются как легкие цепи каппа и ламбда. Настоящее изобретение относится к антителам, обычно на основе класса IgG, который имеет несколько подклассов, включая, но не ограничиваясь ими, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В целом, IgG1, IgG2 и IgG4 используются чаще, чем IgG3. Следует отметить, что IgG1 имеет разные аллотипы с полиморфизмом в 356 (D или E) и 358 (L или M). Последовательности, приведенные в данном документе, используют аллотип 356D/358L, однако другой аллотип включен в данный документ. То есть, любая последовательность, содержащая Fc-домен IgG1, включенный в данный документ, может иметь аллотип 356E/358M, заменяющий 356D/358L.

Как будет понятно специалистам в данной области техники, точная нумерация и размещение CDR могут отличаться в разных системах нумерации. Однако следует понимать, что раскрытие последовательности вариабельной тяжелой и/или вариабельной легкой цепи включает раскрытие связанных (характерных) CDR. Соответственно, раскрытие каждой вариабельной области тяжелой цепи является рас-

крытием vhCDR (например, vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3), а раскрытие каждой вариабельной области легкой цепи является раскрытием vlCDR (например, vlCDR1, vlCDR2 и vlCDR3).

Способы идентификации последовательности каждой из CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 антитела включают: Метод Rabat (Rabat et al., The Journal of Immunology, 1991, Vol. 147, No.5, p. 1709-1719) и метод Chothia (Al-Lazikani et al., Journal of Molecular Biology, 1997, Vol. 273, No.4, p. 927-948). Эти методы известны специалистам в данной области техники, их краткое изложение доступно, например, на веб-сайте Dr. Andrew C.R. Martin's Group (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

Полезное сравнение нумерации CDR приведено ниже, см. Lafranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003):

Таблица 1

	Kabat+ Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Контакт
vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
vlCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
vlCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
vlCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

В данном описании система нумерации Rabat обычно используется для обозначения остатка в вариабельном домене (приблизительно, остатки 1-107 вариабельной области легкой цепи и остатки 1-113 вариабельной области тяжелой цепи), а система нумерации EU для константных областей, таких как Fc-области (например, Rabat et al., выше (1991)).

Данное изобретение предоставляет ряд различных наборов CDR. В этом случае "полный набор CDR" содержит три CDR вариабельного домена тяжелой цепи и три CDR вариабельного домена легкой цепи, например, vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3. Они могут быть частью большего вариабельного домена легкой или тяжелой цепи, соответственно. Кроме того, как более полно описано в данном документе, вариабельные домены тяжелой цепи и вариабельные домены легкой цепи могут находиться в отдельных полипептидных цепях, когда используется тяжелая и легкая цепь (например, когда используются Fab), или в одной полипептидной цепи в случае последовательности scFv.

CDR вносят вклад в образование антигенсвязывающего или, более конкретно, эпитопсвязывающего сайта антител. "Эпитоп" относится к детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Эпитопы представляют собой группы молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахара, и обычно имеют специфические структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Один антиген может иметь более одного эпитопа.

В данном случае эпитоп содержит не только аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании антител по изобретению, но также фосфорилирование по Ser413.

Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию. Rabat et al. собрали многочисленные первичные последовательности вариабельных областей тяжелых цепей и легких цепей. Основываясь на степени консервативности последовательностей, они классифицировали отдельные первичные последовательности как CDR и каркасную область и составили их список (см. SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Rabat et al., полностью включена посредством ссылки).

В подклассе иммуноглобулинов IgG имеется несколько доменов иммуноглобулинов в тяжелой цепи. Под "доменом иммуноглобулина (Ig)" в данном документе подразумевается область иммуноглобулина, имеющая характерную третичную структуру. В данном изобретении интерес представляют домены тяжелой цепи, в том числе константные домены тяжелой цепи (CH) и шарнирные домены. В контексте антител IgG каждый изотипов IgG имеет три области CH. Соответственно, домены "CH" в контексте IgG являются следующими: "CH1" относится к положениям 118-220 в соответствии с индексом EU, как в Rabat. "CH2" относится к положениям 237-340 в соответствии с индексом EU, как в Rabat, а "CH3" относится к положениям 341-447 в соответствии с индексом EU как в Rabat.

Другим типом домена Ig тяжелой цепи является шарнирная область. Под "шарниром" или "шарнирной областью", или "шарнирной областью антитела", или "шарнирной областью иммуноглобулина" в данном документе подразумевается гибкий полипептид, содержащий аминокислоты между первым и вторым константными доменами антитела. Структурно домен CH1 IgG заканчивается в положении 220 по EU, а домен CH2 IgG начинается с остатка в положении 237 по EU. Таким образом, для IgG шарнир антитела в данном описании определен как включающий положения от 221 (D221 в IgG1) до 236 (G236 в IgG1), где нумерация соответствует индексу EU, как в Rabat. В некоторых вариантах осуществления, например, в контексте Fc-области, включен нижний шарнир, причем "нижний шарнир" обычно относится к положениям 226 или 230. Как отмечено в данном документе, в шарнирной области также могут быть

осуществлены рi-варианты.

Легкая цепь обычно содержит два домена: переменный домен легкой цепи (содержащий CDR легкой цепи и вместе с переменными доменами тяжелой цепи, образующий Fv-область) и константную область легкой цепи (часто называемую CL или Ck).

Другой областью, представляющей интерес для дополнительных замен, описанной ниже, является Fc-область.

Таким образом, данное изобретение относится к различным доменам антител. Как описано в данном документе и известно в данной области техники, антитела по изобретению содержат различные домены в тяжелой и легкой цепях, которые также могут перекрываться. Эти домены включают, но не ограничиваются ими, домен Fc, домен CH1, домен CH2, домен CH3, шарнирный домен, константный домен тяжелой цепи (домен CH1-шарнир-Fc или CH1-шарнир-CH2-CH3) переменный домен тяжелой цепи, переменный домен легкой цепи, константный домен легкой цепи, домены Fab и домены scFv.

Таким образом, "домен Fc" содержит домен -CH2-CH3 и, необязательно, шарнирный домен. Тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи и константный домен, который содержит домен CH1-шарнир-Fc, содержащий CH2-CH3. Легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. scFv содержит переменный домен тяжелой цепи, линкер scFv и переменный домен легкой цепи. Некоторые варианты осуществления изобретения содержат по меньшей мере один домен scFv, который, хотя и не встречается в природе, обычно включает переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, связанные вместе линкером scFv. Как указано в данном документе, в то время как домен scFv обычно от N- до C-конца ориентирован как vh-scFv линкер-vl, этот порядок можно изменить для любого из доменов scFv (или доменов, сконструированных с использованием последовательностей vh и vl из Fab) на vl-scFv линкер-vh.

Как показано в данном документе, существует ряд подходящих линкеров scFv, которые можно использовать, включая традиционные пептидные связи, создаваемые рекомбинантными технологиями. Линкерный пептид может преимущественно содержать следующие аминокислотные остатки: Gly, Ser, Ala или Thr. Линкерный пептид должен иметь длину, достаточную для связывания двух молекул таким образом, чтобы они принимали правильную конформацию относительно друг друга, чтобы они сохраняли желаемую активность. В одном варианте осуществления линкер имеет длину от около 1 до 50 аминокислот, предпочтительно от около 1 до 30 аминокислот. В одном варианте осуществления могут использоваться линкеры длиной от 1 до 20 аминокислот, причем в некоторых вариантах осуществления могут использоваться от около 5 до около 10 аминокислот. Полезные линкеры включают глицин-сериновые полимеры, включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGS)_n и (GGGS)_n, где n представляет собой целое число, по меньшей мере, единицу (и, как правило, от 3 до 4), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры. В альтернативном варианте различные непротеиновые полимеры, включая, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль, полиоксиалкилены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, могут быть использованы в качестве линкеров.

Другие линкерные последовательности могут включать любую последовательность любой длины домена CL/CH1, но не все остатки домена CL/CH1; например, первые 5-12 аминокислотных остатков доменов CL/CH1. Линкеры могут быть получены из легкой цепи иммуноглобулина, например Ck или Cl. Линкеры могут быть получены из тяжелых цепей иммуноглобулина любого изотипа, включая, например, Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cα1, Cα2, Cδ, Cε и Cμ. Линкерные последовательности также могут быть получены из других белков, таких как Ig-подобные белки (например, TCR, FcR, KIR), последовательности, полученные из шарнирной области, и другие природные последовательности из других белков.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой "доменный линкер", используемый для связывания вместе любых двух доменов, как описано в данном документе. Хотя может быть использован любой подходящий линкер, во многих вариантах осуществления используется глицин-сериновый полимер, включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGS)_n и (GGGS)_n, где n является целым числом, равным, по меньшей мере единице (и обычно от 3 до 4 до 5), а также любая пептидная последовательность, которая обеспечивает рекомбинантное присоединение двух доменов с достаточной длиной и гибкостью, чтобы каждый домен сохранял свою биологическую функцию.

Химерные и гуманизированные антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитела в данном документе могут быть получены из смеси от разных видов, например химерное антитело и/или гуманизированное антитело. В целом, как "химерные антитела", так и "гуманизированные антитела" относятся к антителам, которые объединяют области более чем одного вида. Например, "химерные антитела" традиционно включают переменную область (области) от мыши (или крысы, в некоторых случаях) и константную область (области) от человека. "Гуманизированные антитела" обычно относятся к нечеловеческим антителам, у которых каркасные области переменного домена были заменены на последовательности, обнаруживаемые в антителах человека. Как правило, в гуманизированном антителе все антитело, кроме CDR, кодируется полинуклеотидом человеческого происхождения или является идентичным такому антителу, за исключением его

CDR. CDR, некоторые или все из которых кодируются нуклеиновыми кислотами, происходящими из организма, отличного от человека, прививаются в каркас бета-складчатости вариабельной области антигена человека для создания антитела, специфичность которого определяется привитыми CDR. Создание таких антител описано, например, в WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536, все полностью включено посредством ссылки. "Обратная мутация" выбранных акцепторных каркасных остатков на соответствующие донорные остатки часто требуется для восстановления аффинности, утерянной в исходной привитой конструкции (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, все полностью включены посредством ссылки). Оптимально гуманизованное антитело также будет содержать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека, и, таким образом, обычно будет содержать Fc-область человека. Гуманизованные антитела также могут быть получены с использованием мышей с генетически сконструированной иммунной системой. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654, полностью включена посредством ссылки. Разнообразные методики и методы гуманизации и изменения формы нечеловеческих антител хорошо известны в данной области техники (см. Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA) и ссылки, цитируемые там, все целиком включены посредством ссылки). Методы гуманизации включают, но не ограничиваются ими, методы, описанные в Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8, все полностью включены посредством ссылки. Гуманизация или другие способы снижения иммуногенности вариабельных областей нечеловеческого антитела могут включать методы изменения поверхности, как описано, например, в Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973, полностью включена посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи из конкретного гена тяжелой цепи иммуноглобулина зародышевой линии и/или вариабельную область легкой цепи из конкретного гена легкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии. Например, такие антитела могут содержать или состоять из антитела человека, содержащего вариабельные области тяжелой или легкой цепи, которые являются "продуктом" или "получены из" определенной последовательности зародышевой линии. Антитело человека, которое является "продуктом" или "получено из" последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, можно идентифицировать как таковое путем сравнения аминокислотной последовательности антитела человека с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека и выбора последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, которая наиболее близка по последовательности (то есть имеет наибольший % идентичности) к последовательности антитела человека. Антитело человека, которое является "продуктом" или "получено из" определенной последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, может содержать аминокислотные различия по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, вследствие естественных соматических мутаций или преднамеренного введения сайт-направленной мутации. Однако гуманизованное антитело, как правило, по меньшей мере на 80% идентично по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека, и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют антитело как происходящее из последовательностей человека, при сравнении с аминокислотными последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии других видов (например, последовательностями зародышевой линии мыши). В определенных случаях гуманизованное антитело может быть, по меньшей мере, на 95, 96, 97, 98 или 99% или даже, по меньшей мере, на 96%, 97%, 98% или 99% идентичным по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Как правило, гуманизованное антитело, полученное из конкретной последовательности зародышевой линии человека, будет иметь не более 10-20 аминокислотных отличий от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека. В некоторых случаях гуманизованное антитело может иметь не более 5 или даже не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотного отличия с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

В одном варианте осуществления родительское антитело имеет созревшую аффинность, как известно в данной области техники. Для гуманизации и созревания аффинности могут быть использованы структурно-ориентированные методы, например, как описано в патенте США № 7657380. Методы на основе селекции могут быть использованы для гуманизации и/или созревания аффинности вариабельных областей антител, включая, без ограничения, методы, описанные в Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Vaca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37):22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759, все полностью включены посредством ссылки. Другие методы гуманизации могут включать прививание только частей CDR, включая, без ограничения, методы, описанные в Tan et al., 2002, J.

Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084, все полностью включены посредством ссылки.

Термин "антитело" используется в самом широком смысле и включает, например, интактный иммуноглобулин или антигенсвязывающую часть. Антигенсвязывающие участки могут быть получены с помощью технологий рекомбинантных ДНК или ферментативного или химического расщепления интактных антител. Таким образом, термин антитело включает традиционные тетрамерные антитела из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, а также антигенсвязывающие фрагменты, такие как Fv, Fab и scFv. В некоторых случаях изобретение относится к биспецифическим антителам, которые содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, как указано в данном документе.

Гуманизированное антитело против фосфорилированного тау по данному изобретению предпочтительно должно проявлять улучшенную кинетику в плазме. Улучшение кинетики в плазме гуманизированного антитела в данном документе означает, что параметр, представляющий кинетику гуманизированного антитела в плазме, изменяется по сравнению с негуманизированным антителом, соответствующим гуманизированному антителу. Примеры параметров, представляющих кинетику в плазме, включают: период полужизни в плазме, среднее время удержания в плазме и клиренс из плазмы. Такой параметр, как "измененный" означает, что параметр увеличивается или уменьшается. Негуманизированное антитело, "соответствующее" гуманизированному антителу, означает негуманизированное антитело, используемое в качестве основы для получения гуманизированного антитела, например антитела мыши или химерного антитела.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, которое содержит одну или более областей из одного антитела и одну или более областей из одного или более других антител. "Антитело с привитыми CDR" представляет собой антитело, содержащее одну или более CDR, полученных из антитела определенного вида или изотипа, и каркас другого антитела того же или другого вида или изотипа.

Композиции.

В данном изобретении предложен ряд различных антигенсвязывающих доменов (обычно включаемых в антитела), которые связываются с тау-белком человека, который фосфорилируется по Ser413 (pSer413), в "реакции антиген-антитело".

"Реакция антиген-антитело" измеряется по аффинности антитела к фосфорилированному тау-белку или фосфорилированному тау-пептиду, то есть по равновесной константе диссоциации (K_D). В определенных вариантах осуществления значение K_D измеряют с фосфорилированным тау-белком. В некоторых вариантах осуществления значение K_D измеряют с фосфорилированным тау-пептидом. В одном варианте осуществления фосфорилированный тау-пептид фосфорилирован только в одном остатке (например, SEQ ID NO: 75). В другом варианте осуществления фосфорилированный пептид фосфорилирован во множестве остатков (например, SEQ ID NO: 76 или SEQ ID NO: 78). В некоторых вариантах осуществления значение K_D измеряют с иммобилизованным антигеном (например, фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом), и в этом случае измерение аффинности включает компонент avidности, т.е. происходит в режиме двухвалентного связывания. В других вариантах осуществления значение K_D измеряют с иммобилизованным антителом (например, родительским антителом мыши, химерным антителом или вариантами гуманизированного антитела), и в этом случае измерение аффинности не включает компонент avidности, т.е. происходит в режиме одновалентного связывания. В других вариантах осуществления значение K_D измеряют с иммобилизованным антителом и с фосфорилированным тау-белком в качестве аналита. В других вариантах осуществления значение K_D измеряют с иммобилизованным антителом и с фосфорилированным тау-пептидом в качестве аналита. В определенных вариантах осуществления значение K_D измеряют в режиме двухвалентного связывания. В других вариантах осуществления значение K_D измеряют в режиме одновалентного связывания.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления значение K_D составляет 5×10^{-8} М или менее; в некоторых вариантах осуществления значение K_D составляет 5×10^{-9} М или менее; в других вариантах осуществления значение K_D составляет 5×10^{-10} М или менее; в других вариантах осуществления значение K_D составляет $1,86 \times 10^{-8}$ М или менее; в других вариантах осуществления значение K_D составляет 2×10^{-9} М или менее; в других вариантах осуществления значение K_D составляет 2×10^{-10} М или менее. В конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом с K_D , равной 5×10^{-8} М или менее, измеренной с иммобилизованным антителом и фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом в качестве аналита. В другом конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом с K_D , равной 5×10^{-9} М или менее, измеренной с фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом и антителом в качестве аналита. В другом конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом с K_D , равной 2×10^{-9} М или менее, измеренной с фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом и антителом в качестве аналита. В другом конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом с K_D , равной 2×10^{-10} М или менее, измеренной с фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом и антителом в качестве аналита.

тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом с K_D , равной 5×10^{-10} М или менее, измеренной с фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом и антителом в качестве анализата. В другом конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом с K_D , равной 2×10^{-10} М или менее, измеренной с фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом и антителом в качестве анализата.

Кроме того, как указано в данном документе, антитела по изобретению предпочтительно связываются с тау-пептидами или белками, которые фосфорилированы в положении S413, по сравнению с белками или пептидами, которые не содержат фосфат в положении 413.

Гуманизованное антитело против фосфорилированного тау по данному изобретению представляет собой антитело, которое может вызывать реакцию антиген-антитело с фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом по данному изобретению.

Фосфорилированные тау-белки и тау-пептиды, с которыми гуманизованное антитело против фосфорилированного тау по данному изобретению может вызывать реакцию антиген-антитело, представляют собой те, которые фосфорилированы по аминокислотному остатку, который специфически фосфорилируется при нейродегенеративных заболеваниях, таких как БА. В частности, такие тау-белки и тау-пептиды фосфорилированы по меньшей мере по сериновому остатку в положении 413 аминокислотной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1 (Ser413), и также могут быть фосфорилированы по одному или более из аминокислотных остатков, соответствующих номерам аминокислот от 410 до 421, т. е. одному или более аминокислотным остаткам, соответствующим остатку серина в положении 412 (Ser412), остатку треонина в положении 414 (Thr414) и остатку серина в положении 416 (Ser416) аминокислотной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1. Типичные такие фосфорилированные пептиды включают, но не ограничиваются ими: pSer412/pSer413 (Cys-), который имеет аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID NO: 7; pSer413 (Cys-), который имеет аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID NO: 8, и pSer409/pSer412/pSer413 (Cys-), который имеет аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID NO: 9.

Фосфорилированный тау-пептид по данному изобретению можно использовать для получения гуманизованного антитела против фосфорилированного тау по данному изобретению или в качестве антигена для изучения реактивности.

Фосфорилированный тау-пептид по данному изобретению может быть получен специалистом в данной области техники с использованием соответствующих методов синтеза или методов генной инженерии. Примеры способов получения фосфорилированного пептида посредством синтеза включают метод Boc (Wakamiya T., Chemistry Letters, Vol. 22, p. 1401, 1993), Fmoc method (Perich, J. W., International Journal of Peptide and Protein Research, Vol. 40, p. 134-140, 1992) и JP3587390B, и WO2013/180238, хотя специалист в данной области техники может использовать любые другие способы в зависимости от обстоятельств. Примеры способов получения фосфорилированного пептида с помощью генной инженерии включают способ, в котором получают генетический материал (ДНК или РНК), имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую получаемый пептид или его предшественник, и после необязательных этапов, таких как внесение в вектор экспрессии и добавление последовательности промотора, вносят в организм подходящего хозяина для экспрессии или подвергают бесклеточному способу синтеза белка. В этом случае пептид можно фосфорилировать в желаемом сайте, вызывая реакцию фосфорилирования в организме хозяина с помощью ферментов, таких как киназы, которые могут быть либо присущими хозяину, либо их экспрессия может быть обусловлена генной инженерией, или выделяя целевой пептид из организма хозяина и затем вызывая реакцию фосфорилирования с использованием ферментов, таких как киназы. В последнем случае реакция фосфорилирования может быть вызвана *in vitro* путем воздействия на целевой пептид фермента, который, как известно, играет роль в реакции фосфорилирования тау, такого как гликогенсинтазакиназа 3 (GSK3) или циклинзависимая протеинкиназа 5 (CDK5). Из числа пептидов, фосфорилируемых в организме хозяина или *in vitro* в соответствии с вышеуказанными способами, пептиды, фосфорилированные по желаемому аминокислотному остатку, могут быть выделены, например, путем выбора тех, которые специфически связываются с антителом против фосфорилированного тау, указанным выше, посредством реакции антитело-антиген.

Фосфорилированный тау-пептид по данному изобретению может быть модифицирован по своей N-концевой последовательности и/или C-концевой последовательности веществом, имеющим другие функции, подходящие для желаемых целей. Например, фосфорилированный тау-пептид по данному изобретению может быть дополнен в N-конце и/или C-конце, например, остатком метионина, ацетильной группой или пироглутаминовой кислотой, или модифицирован в N-конце и/или C-конце, например, флуоресцентным материалом. В альтернативном варианте N-конец и/или C-конец фосфорилированного тау-пептида по данному изобретению можно модифицировать, например, пептидом или белком. Примеры пептидов, пригодных для такой модификации, включают подходящие последовательности меток (обычно гистидиновую метку или метку FLAG), пептиды, имеющие аминокислотные последовательности, которые могут распознаваться T-клеточным рецептором (ТКР) или главным комплексом гистосов-

местимости (ГКГС), белки, полученные из вирусов или бактерий, или пептиды, имеющие последовательности, полученные из таких белков. Кроме того, фосфорилированный тау-пептид по данному изобретению включает те, которые имеют, по меньшей мере, один аминокислотный остаток, отличный от N-концевых и C-концевых остатков, модифицированный любым другим соединением или пептидом. Специалист в данной области техники сможет осуществить такую модификацию фосфорилированного тау-пептида, используя любые известные методы, такие как методы, описанные в Hermanson et al., "Bioconjugate Techniques", (US), Academic Press, 1996.

Специалист в данной области техники сможет провести измерение реакции антиген-антитело, выбрав подходящий анализ связывания в системе твердой фазы или жидкой фазы. Примеры таких анализов включают, но не ограничиваются ими: твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА), иммуноферментный анализ (ИФА), поверхностный плазмонный резонанс (ППР), резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) и резонансный перенос энергии люминесценции (LRET). Измерение аффинности связывания антиген-антитело может быть выполнено, например, путем мечения антитела и/или антигена, например, ферментом, флуоресцентным материалом, люминесцентным материалом или радиоизотопом, и определения реакции антиген-антитело с использованием метод, подходящего для определения физических и/или химических свойств, характерных для используемой метки.

Гуманизированное антитело против фосфорилированного тау по данному изобретению предпочтительно должно иметь улучшенную аффинность селективного связывания с фосфорилированным тау-белком или тау-пептидом по сравнению с его аффинностью связывания с нефосфорилированным тау-белком или тау-пептидом. Улучшение аффинности селективного связывания антитела с фосфорилированным тау-белком или тау-пептидом в этом контексте означает, что отношение аффинности связывания антитела с фосфорилированным тау-белком или тау-пептидом к его аффинности связывания с соответствующим нефосфорилированным тау-белком или тау-пептидом увеличивается. Такая селективная аффинность связывания может быть проанализирована, например, с использованием планшета, на котором иммобилизован фосфорилированный тау-белок или тау-пептид, и планшета, на котором иммобилизован соответствующий нефосфорилированный тау-белок или тау-пептид, путем измерения аффинности связывания антитела к каждому из этих белков или пептидов, например, с помощью твердофазного ИФА (например, в виде значения ОП (оптической плотности) поглощения длины волны излучения) и деления значения аффинности связывания (например, значения ОП поглощения), полученного для фосфорилированного белка тау или пептида тау, на значение, полученное для соответствующего нефосфорилированного тау-белка или тау-пептида. Конкретные условия для твердофазного ИФА могут быть такими, как описано в разделе "Примеры" ниже.

Гуманизированное антитело против фосфорилированного тау согласно данному изобретению предпочтительно должно иметь отношение селективной аффинности связывания к фосфорилированному тау-белку или тау-пептиду к аффинности связывания для нефосфорилированного тау-белка или тау-пептида, равное по меньшей мере, около 40 или более, в частности, по меньшей мере, около 50 или более, более конкретно, по меньшей мере, около 60 или более, при условии, что селективная аффинность связывания получается в соответствии со способом, описанным в Примере 2 ниже. В одном варианте осуществления отношение рассчитывают путем сравнения аффинности связывания антител против pSer413 с фосфорилированным пептидом, таким как SEQ ID NO: 8, с аффинностью связывания с нефосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 69.

Гуманизированное антитело против фосфорилированного тау по данному изобретению предпочтительно должно проявлять улучшенную способность проникать в мозг при введении в кровь. Улучшение способности антитела проникать в мозг при введении в кровь в этом контексте означает, что когда антитело вводят в кровь человека или любого другого млекопитающего (например, мыши или крысы), соотношение концентрации антител в мозге к концентрации антител в плазме увеличивается. Способность антитела проникать в мозг может быть проанализирована, например, путем введения антитела животному (например, мыши или крысе) через кровь и, после предварительно определенного периода (например, одна неделя), сбора крови и подготовки гомогената ткани мозга, измерения концентрации антител в каждом из полученного образца плазмы и полученного образца гомогената мозга с использованием известного метода (например, сэндвич-ИФА с использованием поликлонального античеловеческого антитела) и деления концентрации антитела в мозге на концентрацию антитела в плазме. Конкретные условия для твердофазного ИФА могут быть такими, как описано в разделе "Примеры" ниже. Известно, что концентрация антитела, поступающего в мозг, обычно составляет около 0,1-0,3% от концентрации в плазме.

Гуманизированное антитело против фосфорилированного тау согласно данному изобретению предпочтительно должно иметь отношение концентрации антитела в мозге к концентрации антитела в плазме крови, равное 0,30% или более, в частности 0,35% или более, более конкретно 0,40% или более, еще более конкретно, 0,45% или более, при условии, что соотношение получено в соответствии со способом, описанным в "(7) примера 7": Анализ "внутрицеребральной миграции" в разделе примеров ниже.

Антигенсвязывающие домены по изобретению

В данном изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые предпочтительно связываются с тау-белком pSer413 человека по сравнению с тау-белками, которые не фосфорилированы в

Ser413, как описано в данном документе.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 91, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 92, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 93, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 94, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 95, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 96, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 97, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 98, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 99, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 100, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 101, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые содержат v1CDR1, имеющую SEQ ID NO: 102, v1CDR2, имеющую SEQ ID NO: 82; v1CDR3, имеющую SEQ ID NO: 83; vhCDR1, имеющую SEQ ID NO: 86; vhCDR2, имеющую SEQ ID NO: 115, и vhCDR3, имеющую SEQ ID NO: 88.

В изобретении предложены антигенсвязывающие домены к тау-белку pSer413 человека. Как показано в примерах, предложен ряд гуманизованных переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи, которые могут быть объединены в любой комбинации и могут быть добавлены к константным доменам IgG человека в любой комбинации.

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи Ta1505-VL46 (SEQ ID NO: 84) комбинируют с переменным доменом тяжелой цепи Ta1505-VH11 (SEQ ID NO: 116) для создания Fv-домена, который связывает pSer413 тау. В этом варианте осуществления константный домен тяжелой цепи человека выбран из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126, а константный домен каппа легкой цепи человека представлен SEQ ID NO: 52.

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи Ta1505-VL46 (SEQ ID NO: 84) комбинируют с переменным доменом тяжелой цепи Ta1505-VH65 (SEQ ID NO: 117). В этом варианте осуществления константный домен тяжелой цепи человека выбран из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126, а константный домен каппа легкой цепи человека представлен SEQ ID NO: 52.

NO: 52.

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи Ta1505-VL46_N33D (SEQ ID NO: 110) комбинируют с переменным доменом тяжелой цепи Ta1505-VH65 (SEQ ID NO: 117). В этом варианте осуществления константный домен тяжелой цепи человека выбран из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126, а константный домен каппа легкой цепи человека представлен SEQ ID NO: 52.

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи Ta1505-VL46_N33S (SEQ ID NO: 111) комбинируют с переменным доменом тяжелой цепи Ta1505-VH11 (SEQ ID NO: 116). В этом варианте осуществления константный домен тяжелой цепи человека выбран из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126, а константный домен каппа легкой цепи человека представлен SEQ ID NO: 52.

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи Ta1505-VL46_N33S (SEQ ID NO: 111) комбинируют с переменным доменом тяжелой цепи Ta1505-VH65 (SEQ ID NO: 117). В этом варианте осуществления константный домен тяжелой цепи человека выбран из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126, а константный домен каппа легкой цепи человека представлен SEQ ID NO: 52.

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи Ta1505-VL46_N33T (SEQ ID NO: 112) комбинируют с переменным доменом тяжелой цепи Ta1505-VH11 (SEQ ID NO: 116). В этом варианте осуществления константный домен тяжелой цепи человека выбран из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126, а константный домен каппа легкой цепи человека представлен SEQ ID NO: 52.

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи Ta1505-VL46_N33T (SEQ ID NO: 112) комбинируют с переменным доменом тяжелой цепи Ta1505-VH65 (SEQ ID NO: 117). В этом варианте осуществления константный домен тяжелой цепи человека выбран из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126, а константный домен каппа легкой цепи человека представлен SEQ ID NO: 52.

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи Ta1505-VL46_S28N (SEQ ID NO: 113) комбинируют с переменным доменом тяжелой цепи Ta1505-VH11 (SEQ ID NO: 116). В этом варианте осуществления константный домен тяжелой цепи человека выбран из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126, а константный домен каппа легкой цепи человека представлен SEQ ID NO: 52.

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи Ta1505-VL46_S28N (SEQ ID NO: 113) комбинируют с переменным доменом тяжелой цепи Ta1505-VH65 (SEQ ID NO: 117). В этом варианте осуществления константный домен тяжелой цепи человека выбран из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126, а константный домен каппа легкой цепи человека представлен SEQ ID NO: 52.

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи Ta1505-VL46_G34A_S28N (SEQ ID NO: 114) комбинируют с переменным доменом тяжелой цепи Ta1505-VH11 (SEQ ID NO: 116). В этом варианте осуществления константный домен тяжелой цепи человека выбран из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126, а константный домен каппа легкой цепи человека представлен SEQ ID NO: 52.

В одном варианте осуществления переменный домен легкой цепи Ta1505-VL46_G34A_S28N (SEQ ID NO: 114) комбинируют с переменным доменом тяжелой цепи Ta1505-VH65 (SEQ ID NO: 117). В этом варианте осуществления константный домен тяжелой цепи человека выбран из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126, а константный домен каппа легкой цепи человека представлен SEQ ID NO: 52.

Гуманизированное антитело против фосфорилированного тау согласно данному изобретению также должно предпочтительно иметь переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, имеющие специфические аминокислотные последовательности, в частности, указанные ниже.

В качестве переменной области тяжелой цепи антитело по данному изобретению предпочтительно должно содержать аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более, в частности, 85% или более, более конкретно 90% или более, еще более конкретно 95% или более, еще более конкретно 100%, идентичности с последовательностью, выбранной из последовательности VH11 (определенной в SEQ ID NO: 18), последовательности VH12 (указанной в SEQ ID NO: 20),

последовательности VH47 (определенной в SEQ ID NO: 22), последовательности VH61 (определенной в SEQ ID NO: 24), последовательности VH62 (определенной в SEQ ID NO: 26), последовательности VH64 (определенной в SEQ ID NO: 28) и последовательности VH65 (определенной в SEQ ID NO: 30). В одном варианте осуществления антитело по данному изобретению может содержать в качестве переменной области тяжелой цепи аминокислотную последовательность последовательности VH65 или аминокислотную последовательность, полученную из последовательности VH65 посредством одной или более замен, выбранных из группы, состоящей из: замены Ala в положении 28 (№ по Rabat: H28) на Thr; замены Asp в положении 30 (№ по Rabat: H30) на Ser; замены Val в положении 49 (№ по Rabat: H49) на

Gly; замены Ala в положении 64 (№ по Rabat: H61) на Asp и замены Gln в положении 78 (№ по Rabat: H75) на Lys.

В качестве вариабельной области легкой цепи антитело по данному изобретению предпочтительно должно содержать аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более, в частности, 85% или более, более конкретно 90% или более, еще более конкретно 95% или более, еще более конкретно 100% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательности VL15 (определенной в SEQ ID NO: 32), последовательности VL36 (определенной в SEQ ID NO: 34), последовательности VL46 (определенной в SEQ ID NO: 36), последовательности VL47 (определенной в SEQ ID NO: 38), последовательности VL48 (определенной в SEQ ID NO: 40) и последовательности VL50 (определенной в SEQ ID NO: 42). В одном варианте осуществления антитело по данному изобретению может содержать в качестве вариабельной области легкой цепи аминокислотную последовательность последовательности VL47 или аминокислотную последовательность, полученную из последовательности VL47 посредством одной или более замен, выбранных из группы, состоящей из: замены Asp в положении 17 (№ по Rabat: L17) на Glu; замены Ser в положении 28 (№ по Kabat: L27A) на Asp; замены Gln в положении 42 (№ по Rabat: L37) на Leu; замены Gln в положении 50 (№ по Rabat: L45) на Arg и замены Arg в положении 51 (№ по Rabat: L46) на Leu.

В другом варианте осуществления гуманизованное антитело против фосфорилированного тау по данному изобретению может содержать любую комбинацию, выбранную из:

- (1) последовательности VH11 (SEQ ID NO: 116) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL15 (SEQ ID NO: 32) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (2) последовательности VH11 (SEQ ID NO: 116) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL36 (SEQ ID NO: 34) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (3) последовательности VH11 (SEQ ID NO: 116) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL46 (SEQ ID NO: 36) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (4) последовательности VH11 (SEQ ID NO: 116) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL47 (SEQ ID NO: 38) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (5) последовательности VH11 (SEQ ID NO: 116) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL48 (SEQ ID NO: 40) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (6) последовательности VH11 (SEQ ID NO: 116) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL50 (SEQ ID NO: 42) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (7) последовательности VH12 (SEQ ID NO: 20) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL48 (SEQ ID NO: 40) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (8) последовательности VH47 (SEQ ID NO: 22) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL48 (SEQ ID NO: 40) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (9) последовательности VH61 (SEQ ID NO: 24) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL48 (SEQ ID NO: 40) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (10) последовательности VH62 (SEQ ID NO: 26) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL48 (SEQ ID NO: 40) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (11) последовательности VH64 (SEQ ID NO: 28) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL47 (SEQ ID NO: 38) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (12) последовательности VH64 (SEQ ID NO: 28) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL48 (SEQ ID NO: 40) в качестве вариабельной области легкой цепи;
- (13) последовательности VH65 (SEQ ID NO: 117) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и последовательности VL47 (SEQ ID NO: 37) в качестве вариабельной области легкой цепи;

Выбирая аминокислотные последовательности CDR и/или вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи из указанных выше и комбинируя их с аминокислотными последовательностями каркасных областей и/или константных областей тяжелой цепи и легкой цепи человека в случае необходимости, специалист в данной области техники сможет сконструировать гуманизованное антитело против фосфорилированного тау в соответствии с данным изобретением. Аминокислотные последовательности каркасных областей и/или константных областей тяжелой цепи и легкой цепи антитела человека могут быть выбраны, например, из подтипов IgG, IgA, IgM, IgE и IgD человека или их вариантов.

Специфические антитела против pSer413 тау

В изобретении предложен ряд специфических антител, включающих следующие пары последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи:

- mAb-aPT1: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 144;
- mAb-aPT2: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 145;
- mAb-aPT3: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 146;
- mAb-aPT4: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 147;
- mAb-aPT5: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 148;
- mAb-aPT6: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 149;
- mAb-aPT7: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 150;
- mAb-aPT8: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 151;

mAb-aPT9: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 152;
mAb-aPT10: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 153;
mAb-aPT11: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 154;
mAb-aPT12: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 155;
mAb-aPT13: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 156;
mAb-aPT14: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 157;
mAb-aPT15: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 158;
mAb-aPT16: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 159;
mAb-aPT17: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 160;
mAb-aPT18: LC SEQ ID NO: 184 и HC SEQ ID NO: 161;
mAb-aPT19: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 144;
mAb-aPT20: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 145;
mAb-aPT21: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 146;
mAb-aPT22: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 147;
mAb-aPT23: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 148;
mAb-aPT24: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 149;
mAb-aPT25: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 150;
mAb-aPT26: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 151;
mAb-aPT27: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 152;
mAb-aPT28: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 153;
mAb-aPT29: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 154;
mAb-aPT30: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 155;
mAb-aPT31: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 156;
mAb-aPT32: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 157;
mAb-aPT33: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 158;
mAb-aPT34: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 159;
mAb-aPT35: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 160;
mAb-aPT36: LC SEQ ID NO: 185 и HC SEQ ID NO: 161.

Антитела, которые конкурируют за связывание.

В дополнение к антигенсвязывающим доменам и содержащим их антителам, которые связываются с тау-белком человека, фосфорилированным в положении 413 (pSer413), изобретение относится к антителам, которые конкурируют за связывание с перечисленными в данном документе антителами.

Гуманизованное антитело, которое вызывает конкурентное связывание pSer413 тау с гуманизованным антителом против фосфорилированного тау по данному изобретению, также входит в объем данного изобретения. Используемый в данном документе термин "конкурентное связывание" означает, что, когда два или более моноклональных антитела связываются с антигеном, связывание одного из антител с антигеном ингибирует связыванием другого антитела с антигеном. Конкурентное связывание обычно может быть измерено, например, путем добавления к постоянному количеству (концентрации) моноклонального антитела другого моноклонального антитела с варьирующимся его количеством (концентрацией) и определения количества (концентрации) последнего моноклонального антитела, при котором степень связывания предыдущего моноклонального антитела, имеющегося в постоянном количестве, уменьшается. Степень его ингибирования может быть выражена в единицах IC50 или Ki. Гуманизованное антитело, которое вызывает конкурентное связывание с гуманизованным антителом против фосфорилированного тау по данному изобретению, означает антитело, имеющее IC50, равную 1 мкМ или менее, в частности 100 нМ или менее, более конкретно 10 нМ или менее, при измерении связывания антиген-антитело с использованием гуманизованного антитела против фосфорилированного тау по данному изобретению в концентрации 10 нМ.

Исследования конкурентного связывания могут проводиться, как известно в данной области техники, обычно с использованием анализов связывания SPR/Biacore® или Octet®, а также твердофазного ИФА и клеточных исследований.

В некоторых вариантах осуществления переменные домены тяжелой и легкой цепей антител, демонстрирующих конкурентное связывание, имеют по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности, по меньшей мере, с одной из переменных областей, описанных в данном документе, и в константных доменах имеют по меньшей мере 99 или 100% идентичности с последовательностью IgG человека, описанной на фиг. 13.

Аминокислотные замены.

В дополнение к последовательностям, описанным в данном документе, в изобретении предложены антигенсвязывающие домены и содержащие их антитела, которые могут иметь одну или более аминокислотных замен по сравнению с родительской исходной последовательностью.

Таким образом, например, для всех перечисленных в данном документе переменных доменов тяжелой и легкой цепи могут быть созданы дополнительные варианты. Как указано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления набор из 6 CDR может иметь 0, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных

модификаций (с аминокислотными заменами, находящими конкретное применение). В этих вариантах осуществления, как правило, одна CDR имеет не более 1 или 2 аминокислотных замен, а мутированные последовательности сохраняют связывание с тау-белком pSer413. Однако, когда аминокислотные варианты вносятся в CDR последовательностей, описанных в данном документе, полученные CDR не относятся к CDR мыши, описанным в PCT/JP13/65090 и приведенным в SEQ ID NO: 81, 82 и 83 (CDR варибельной области легкой цепи) и SEQ ID NO: 86, 87 и 88 (CDR варибельной области тяжелой цепи).

В некоторых случаях могут быть сделаны изменения в каркасной области (областях) варибельных доменов тяжелой и/или легкой цепей. В этом варианте предпочтительные варианты в каркасных областях (например, исключая CDR) сохраняют по меньшей мере около 80, 85, 90 или 95% идентичности последовательности с зародышевой линией человека. Таким образом, например, идентичные CDR, как описано в данном документе, могут быть объединены с различными каркасными последовательностями из последовательностей зародышевой линии человека, при условии, что каркасные области сохраняют по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности последовательности с зародышевой линией человека.

В некоторых вариантах осуществления для гуманизованных легких цепей, описанных в данном документе, наиболее близкой зародышевой линией легкой цепи человека является IGKV2-30, которая на 81% идентична последовательностям, представленным в данном документе. Таким образом, дополнительные варианты могут быть созданы в каркасных областях легких цепей при условии, что идентичность составляет по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% с IGKV2-30.

Для гуманизованных тяжелых цепей в данном случае наиболее близкая зародышевая линия человека для тяжелой цепи представляет собойIGHV3-73, которая на 85% идентична последовательностям, представленным в данном документе. Таким образом, дополнительные варианты могут быть созданы в каркасных областях легких цепей при условии, что идентичность составляет по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% сIGHV3-73.

В альтернативном варианте CDR могут иметь аминокислотные модификации (например, из 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных модификаций в наборе CDR (то есть CDR могут быть модифицированы при условии, что общее количество изменений в наборе из 6 CDR составляет менее 6 аминокислотных модификаций, причем любая комбинация CDR изменяется; например, может быть одно изменение в vICDR1, два в vICDR2, ни одного в vICDR3 и т. д.)), а также изменения в каркасной области при условии, что каркасные области сохраняют, по меньшей мере, 80, 85 или 90% идентичности с последовательностью зародышевой линии человека, а полученные CDR не относятся к CDR мыши, описанным в PCT/JP13/65090 и приведенным в SEQ ID NO: 81, 82 и 83 (CDR варибельной области легкой цепи) и SEQ ID NO: 86, 87 и 88 (CDR варибельной области тяжелой цепи).

Как правило, процент идентичности для сравнения между антителами против pSer413 тау составляет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере около 95, 96, 97, 98 или 99%. Процент идентичности может быть определен вдоль всей аминокислотной последовательности, например, всей тяжелой или легкой цепи или вдоль части цепей. Например, в определении антител против pSer413-тау по изобретению включены те, которые имеют идентичность вдоль всей варибельной области (например, где идентичность составляет 95 или 98% вдоль варибельных областей) или вдоль всей константной области.

Нуклеиновые кислоты по изобретению.

Также предоставлены композиции нуклеиновых кислот, кодирующие антитела против pSer413 тау по изобретению, а также векторы экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, трансформированные композициями нуклеиновой кислоты и/или вектора экспрессии. Как будет понятно специалистам в данной области техники, последовательности белка, приведенные в данном документе, могут кодироваться любым числом возможных последовательностей нуклеиновых кислот вследствие вырожденности генетического кода.

Таким образом, в изобретении дополнительно предложены композиции нуклеиновых кислот, кодирующих антигенсвязывающие домены и содержащие их антитела. Как будет понятно специалистам в данной области техники, в случае антигенсвязывающих доменов композиции нуклеиновых кислот обычно содержат первую нуклеиновую кислоту, кодирующую варибельный домен тяжелой цепи, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую варибельный домен легкой цепи. В случае scFv может быть получена одна нуклеиновая кислота, кодирующая варибельные домены тяжелой и легкой цепей, разделенные белковым линкером. В случае традиционных антител композиции нуклеиновых кислот обычно содержат первую нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь, которые после экспрессии в клетке самопроизвольно собираются в "традиционный" тетрамерный формат из двух тяжелых цепей и двух легких цепей.

Как известно в данной области техники, нуклеиновые кислоты, кодирующие компоненты изобретения, могут быть включены в векторы экспрессии, как известно в данной области техники, и в зависимости от клеток-хозяев, использованы для получения гетеродимерных антител по изобретению. Как будет понятно специалистам в данной области техники, эти две нуклеиновые кислоты могут быть включены в один вектор экспрессии или в два разных вектора экспрессии. Как правило, нуклеиновые кислоты функционально связаны с любым количеством регуляторных элементов (промоторы, точки начала реплика-

ции, селективные маркеры, сайты связывания рибосом, индукторы и т.д.). Векторы экспрессии могут быть внехромосомными или интегрирующимися векторами.

Затем нуклеиновые кислоты и/или векторы экспрессии по изобретению трансформируют в любое количество различных типов клеток-хозяев, как это хорошо известно в данной области техники, включая клетки млекопитающих, бактерий, дрожжей, насекомых и/или грибов, при этом клетки млекопитающих (например, клетки CHO) находят применение во многих вариантах осуществления.

Антитела по изобретению получают путем культивирования клеток-хозяев, содержащих вектор(ы) экспрессии, как это хорошо известно в данной области техники. После получения выполняются традиционные этапы очистки антител.

Биологические и биохимические анализы.

Антитела против pSer413 тау по изобретению можно анализировать в отношении эффективности несколькими способами. Предварительно, антитела можно исследовать в отношении связывания с тау-белком человека или пептидами, которые фосфорилированы в положении S413, с использованием методов, известных в данной области техники, таких как методики твердофазного ИФА (см., например, пример 2 (1)), Octet, Biacore или FACS, в которых связывание с фосфорилированными пептидами (например, SEQ ID NO: 8) сравнивают со связыванием с нефосфорилированными пептидами (например, SEQ ID NO: 69), как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления эффективность связывания антител, раскрытых в данном документе, измеряют с помощью анализа Biacore. В определенных вариантах осуществления значение K_D измеряют с фосфорилированным тау-белком. В некоторых вариантах осуществления значение K_D измеряют с фосфорилированным тау-пептидом. В одном варианте осуществления фосфорилированный тау-пептид фосфорилируется только в одном остатке (например, SEQ ID NO: 75). В другом варианте осуществления фосфорилированный пептид фосфорилируется во множестве остатков (например, SEQ ID NO: 76 или SEQ ID NO: 78). В некоторых вариантах осуществления значение K_D измеряют с иммобилизованным антигеном (например, фосфорилированным тау-белком или фосфорилированным тау-пептидом), и в этом случае измерение аффинности включает компонент avidности, т. е. происходит в режиме двухвалентного связывания. В других вариантах осуществления значение K_D измеряют с иммобилизованным антителом (например, родительским антителом мыши, химерным антителом или вариантами гуманизированного антитела), и в этом случае измерение аффинности не включает компонент avidности, т.е. происходит в режиме одновалентного связывания. В других вариантах осуществления значение K_D измеряют с иммобилизованным антителом и с фосфорилированным тау-белком в качестве аналита. В других вариантах осуществления значение K_D измеряют с иммобилизованным антителом и с фосфорилированным тау-пептидом в качестве аналита. В определенных вариантах осуществления значение K_D измеряют в режиме двухвалентного связывания. В других вариантах осуществления значение K_D измеряют в режиме одновалентного связывания.

Кроме того, антитела против pSer413 тау по изобретению также можно анализировать в отношении аффинности связывания в гомогенатах мозга человека с БА, а также анализировать в исследованиях нейтрализации БА-полученных посевных культур тау в анализе агрегации тау P301L в HEK293 и/или в моделях посева и распространения БА-полученного тау с использованием нейронов iPSC человека в микрофлюидных камерах.

Кроме того, антитела против pSer413 тау по изобретению также можно использовать в иммуногистохимических анализах образцов мозга пациентов с БА.

Кроме того, антитела против pSer413 тау по изобретению можно анализировать в отношении эффективности на животных моделях когнитивных расстройств, включая болезнь Альцгеймера (БА). Животные для исследования терапевтических или профилактических агентов от когнитивных расстройств по изобретению включают животные модели когнитивных расстройств, в частности, животные модели таупатий. Животные модели таупатий представляют собой животных, экспрессирующих тау нормального типа или мутантный тау в головном мозге, и, в частности, животные модели, демонстрирующие нарушение когнитивной функции. Такие животные, экспрессирующие тау нормального типа или мутантный тау в мозге, могут быть получены с помощью генной инженерии, типичным примером являются трансгенные мыши (мыши Tg). Животные модели, такие как мыши Tg, которые экспрессируют мутантный тау, полезны в качестве моделей генетических наследственных таупатий, но в случае изучения эффекта терапевтического агента или профилактического агента от спорадических таупатий, которые составляют большинство случаев среди людей, предпочтительно эффект проявляется у мышей Tg, экспрессирующих тау нормального типа. Наиболее подходящими в качестве мышей Tg, экспрессирующих тау нормального типа, являются мыши, полученные в примерах получения по данному изобретению, но также можно использовать мышей Tg, описанных Kambe et al. (Neurobiology of Disease, Vol. 42, P.404-414, 2011) и Kimura et al. (The EMBO J. vol.26. P.5143-5152, 2007), обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте и конкретно для создания и использования трансгенных мышей. Однако, хотя у мышей по Kambe et al. наблюдается нарушение когнитивной функции, оно появляется после 14 месяцев и 20 месяцев, соответственно, и, следовательно, начало проявляется уже в процессе старения и эффекты старения также могут быть способствующими факторами, в то время как

эффекты и затраты на долгосрочное разведение также вызывают осложнения.

Предпочтительным методом исследования действия терапевтического агента или профилактического агента на когнитивные расстройства в соответствии с изобретением в животной модели является метод исследования когнитивной функции, такой как тест на обучение памяти. Такой метод может быть тестом с водным лабиринтом Морриса, пошаговым тестом обучения или тестом распознавания нового объекта, но предпочтительно он представляет собой комбинацию тестов для поведенческих измерений, таких как тест открытого поля, чтобы принять во внимание условия количества поведения и беспокойства животных.

В качестве способов исследования действия терапевтического агента или профилактического агента на когнитивные расстройства в соответствии с изобретением можно использовать методы исследования уровней тау-белка или фосфорилированного тау в ткани мозга во время введения в животной модели когнитивного расстройства. При БА и других нейродегенеративных заболеваниях уровни экспрессии тау-белка или повышенное патологическое фосфорилирование тау связаны с патологией (Khalid Iqbal et al., *Curr. Alzheimer Res.*, Vol. 7, p654-664, 2010). Также хорошо известно, что снижение экспрессии тау и аномальные уровни фосфорилированного тау у некоторых патологических модельных животных приводят к улучшению когнитивной функции и моторной функции (K. Santa Cruz et al., *Science*, 30, Vol. 9, p. 476-481, 2005; Sylvie Le Corre et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol. 103, p. 9673-9678, 2006). В качестве метода изучения изменений в тау-белке или фосфорилированном тау, это может быть достигнуто с помощью такого метода, как вестерн-блоттинг с использованием гомогената ткани мозга, как описано в примерах, но специалист в данной области может выбрать другой подходящий метод, такой как твердофазный ИФА (Xiyun Chai et al., *J. Biol. Chem.*, Vol. 286, p. 34457-34467, 2011) или иммуногистохимический метод (David J. Irwin et al., *BRAIN*, Vol. 135, p. 807-818, 2012).

Составы.

Составы антител, используемых согласно настоящему изобретению, готовят для хранения путем смешивания антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (которые в целом описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]) в форме лиофилизированных составов или водных растворов.

Терапевтический или профилактический агент от когнитивных расстройств в соответствии с данным изобретением может быть составлен в форме фармацевтической композиции, содержащей, помимо гуманизированного антитела против фосфорилированного тау в соответствии с данным изобретением, фармацевтически приемлемый носитель и/или другие вспомогательные вещества. Состав с использованием фармацевтически приемлемого носителя и/или других вспомогательных веществ может быть изготовлен с использованием способа, описанного, например, в University of the Sciences in Philadelphia, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th EDITION", Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Такое терапевтический или профилактический агент может быть предоставлен в виде жидкой композиции, приготовленной растворением, суспендированием или эмульгированием ингредиентов в стерильной водной среде или масляной среде, или в виде лиофилизированной композиции. Среда или растворитель для приготовления такого состава могут представлять собой водную среду, примеры которой включают дистиллированную воду для инъекций и физиологический солевой раствор, который при желании можно использовать с добавлением осморегулирующего агента (например, D-глюкозы, D-сорбита, D-маннита и хлорида натрия) и/или в сочетании с подходящим растворяющим средством, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль), или неионогенным поверхностно-активным веществом (например, полисорбатом 80 или полиоксиэтиленовым гидрогенизированным касторовым маслом 50). Такой состав также может быть приготовлен с маслянистой средой или растворителем, примеры которых включают кунжутное масло и соевое масло, которые необязательно можно использовать в сочетании с растворяющим средством, таким как бензилбензоат и бензиловый спирт. Такие жидкие лекарственные средства часто могут быть приготовлены с использованием соответствующих добавок, таких как буферные агенты (например, фосфатные буферные агенты и ацетатные буферные агенты), смягчающие агенты (например, хлорид бензалкония и гидрохлорид прокаина), стабилизаторы (например, человеческий сывороточный альбумин и полиэтиленгликоль), консерванты (например, аскорбиновая кислота, эриторбиновая кислота и их соли), красители (например, хлорофилл-β-каротин меди, красный № 2 и синий № 1), антисептические агенты (например, сложные эфиры параоксибензойной кислоты, фенол, хлорид бензетония и бензалкония хлорид), загустители (например, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза и их соли), стабилизаторы (например, человеческий сывороточный альбумин, маннит и сорбит) и средства, устраняющие запахи (например, ментоловые и цитрусовые ароматы). Различные формы терапевтических или профилактических агентов включают твердые препараты, такие как порошки, таблетки, гранулы, капсулы, пилюли, суппозитории и пастилки. Для твердого препарата для перорального применения могут быть использованы добавки, такие как наполнители (например, кристаллическая целлюлоза, лактоза и крахмал), смазывающие вещества (например, стеарат магния и тальк), связующие вещества (гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, макрогол и тому подобное) и дезинтеграторы (например, крахмал и карбоксиметилцеллюлоза кальция). При необхо-

димости могут быть использованы добавки, такие как антисептики (например, бензиловый спирт, хлорбутанол, метилпараоксибензоат и пропилпараоксибензоат), антиоксиданты, красители, подсластители и тому подобное. Другие альтернативные формы включают терапевтические агенты или профилактические средства для нанесения на слизистые оболочки, такие составы часто содержат добавки, такие как чувствительные к давлению адгезивы, чувствительные к давлению усилители, регуляторы вязкости, загущающие агенты и тому подобное (например, муцин, агар, желатин, пектин), каррагинан, альгинат натрия, камедь рожкового дерева, ксантановую камедь, трагакантовую камедь, гуммиарабик, хитозан, пуллулан, воскообразный крахмал, сукральфат, целлюлозу и ее производные (такие как гидроксипропилметилцеллюлоза), сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот, сополимеры акриловая кислота-алкил(мет)акрилатили их соли и полиглицериновые сложные эфиры жирных кислот), главным образом, для придания свойств адсорбции или удержания в слизистой оболочке. Однако форма, растворитель и добавки для терапевтического агента или профилактического агента, вводимого в организм, не ограничиваются этим, и специалист в данной области техники может сделать соответствующий выбор.

Терапевтическое или профилактическое средство от когнитивных расстройств по данному изобретению может содержать, в дополнение к гуманизированному антителу против фосфорилированного тау по данному изобретению, другие известные лекарственные средства, обладающие эффектом лечения или предотвращения когнитивных расстройств, и, в частности, лекарственные средства, имеющие эффект подавления прогрессирования когнитивных расстройств. В альтернативном варианте терапевтический или профилактический агент от когнитивных расстройств в соответствии с данным изобретением, содержащий гуманизированное антитело против фосфорилированного тау в соответствии с данным изобретением, можно комбинировать с другим терапевтическим или профилактическим агентом, содержащим известное лекарственное средство, обладающее эффектом лечения или предотвращения когнитивных расстройств и, в частности, лекарственное средство, обладающее эффектом ингибирования прогрессирования когнитивных расстройств, для получения в форме набора. Ингредиенты, обладающие эффектами ингибирования прогрессирования когнитивных расстройств, включают, но не ограничиваются ими, донепезил, галантамин, мемантин и ривастигмин. Дозировка ингредиента, обладающего эффектом ингибирования прогрессирования когнитивных расстройств, и дозировка терапевтического или профилактического агента, содержащего ингредиент, обладающий эффектом ингибирования прогрессирования когнитивных расстройств, могут находиться в пределах дозировок, используемых для нормальной терапии, но могут быть увеличены или уменьшены в зависимости от условий.

Хотя авторы данного изобретения указали экспериментальные результаты, в WO2013/180238A (Патентный документ 4), которые демонстрируют, что антитело проявляет лекарственный эффект, воздействуя на мозг через гематоэнцефалический барьер, даже при периферическом введении путем внутривенного введения, также возможно приготовить состав, который эффективно доставляет гуманизированное антитело против фосфорилированного тау по данному изобретению, которое содержится в терапевтическом или профилактическом агенте для лечения когнитивных расстройств по данному изобретению, в ткань мозга. Такие составы также охватываются терапевтическим или профилактическим агентом от когнитивных расстройств согласно изобретению. Известны способы эффективной доставки антител или пептидов в ткани мозга через гематоэнцефалический барьер, такие как способы добавления нацеливающих веществ или способы инкапсулирования в липосомах или наночастицах. Вещества, которые следует использовать для нацеливания, включают вещества, которые подвергаются полному или частичному изменению характеристик заряда в результате связывания с антителом или пептидами, белками или другими соединениями, обладающими свойством связывания со специфическим рецептором или транспортером. Примеры пептидов, белков или других соединений, имеющих свойство связываться со специфическим рецептором или мембранным белком, включают лиганды, которые связываются с рецепторными лигандами или мембранными белками, и их аналоги, а также антитела, соединения-агонисты/соединения-антагонисты/аллостерические модуляторы, которые связываются с рецепторными лигандами или мембранными белками, и их соединения-аналоги. Примеры рецепторных лигандов или мембранных белков в качестве мишеней для пептида, белка или другого соединения, обладающего свойством связывания со специфическим рецептором или транспортером, включают рецептор трансферрина (TfR), рецептор инсулина (IR), рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGFR) белок, связанный с рецептором ЛППП (LRP) и рецептор дифтерийного токсина (HB-EGF), без каких-либо конкретных ограничений (Angela R. Jones et al., *Pharm. Res.*, 2007, Vol. 24, No.9, p. 1759-1771). Вещество для нацеливания может быть химически добавлено к антителу для использования в качестве терапевтического или профилактического агента для лечения когнитивных расстройств в соответствии с изобретением, причем этот способ может быть соответствующим образом осуществлен специалистом в данной области техники со ссылкой на известный метод, такой как описанный, например, в Hermanson et al., *Bioconjugate techniques*, USA, Academic Press, 1996. Вещество для нацеливания также может быть связано с липосомами или наночастицами, инкапсулирующими антитело или пептид (Sonu Bhaskar et al., *Particle and Fibre Toxicology*, 2010, 7:3). Кроме того, когда вещество для нацеливания представляет собой пептид или белок, оно может быть получено в виде подходящего слитого белка специалистом в данной области техники с использованием методов генной инженерии, либо путем получения слитого пептида путем химического

синтеза пептидов, либо путем объединения нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность пептида или белка, с нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность для используемого антитела или пептида.

Терапевтический или профилактический агент согласно данному изобретению можно вводить пациенту, нуждающемуся в этом, перорально или парентерально, с целью улучшения симптомов. Для перорального введения может быть выбрана лекарственная форма, такая как гранулы, порошок, таблетки, капсулы, жидкое лекарственное средство, сироп, эмульсия, суспендирующий агент или эликсир. Для парентерального введения можно приготовить трансназальный агент и выбрать жидкое лекарственное средство, суспензию или твердую композицию. Инъекция может быть приготовлена в виде другой формы парентерального введения, причем инъекцию выбирают из подкожной инъекции, внутривенной инъекции, инфузии, внутримышечной инъекции, внутрисеребровентрикулярной инъекции или внутрибрюшинной инъекции. Другие составы, используемые для парентерального введения, включают суппозитории, сублингвальные агенты, чрескожные агенты и агенты для введения через слизистую оболочку, отличные от трансназальных агентов. Кроме того, внутрисосудистое местное введение возможно путем добавления или нанесения покрытия на стент или внутрисосудистый обтуратор.

Доза агента для лечения или предотвращения согласно изобретению будет отличаться в зависимости от возраста пациента, пола, массы тела и симптомов, терапевтического эффекта, способа введения, времени лечения или типов активных ингредиентов в медицинской композиции, но обычно его можно вводить в диапазоне от 0,1 мг до 1 г и предпочтительно в диапазоне от 0,5 мг до 200 мг активного соединения на введение для взрослых. Однако, поскольку доза будет варьироваться в зависимости от множества условий, могут быть достаточными более низкие дозы, чем упомянутые выше, или могут потребоваться дозы, превышающие эти диапазоны. Агент для лечения или предотвращения согласно изобретению может проявлять эффект в течение короткого периода введения.

Введение антител.

После получения антитела по изобретению находят применение при лечении когнитивных расстройств, таких как таупатии. Как обсуждалось в данном документе, внутриклеточное накопление таубелка было продемонстрировано при различных невропатологических состояниях. Заболевания, вызванные таким внутриклеточным накоплением тау, в совокупности называют "таупатиями" (см. выше Arai, полностью включенную в данное описание посредством ссылки, и для описанных в данном документе расстройств). Таупатии включают нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (БА), кортикобазальную дегенерацию (CBD) или кортикобазальный синдром (CBS), прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Пика, аргирофильную зернистую деменцию (болезнь аргирофильного зерна), множественную системную таупатию с деменцией (MSTD), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17 (FTDP-17), нейрофибриллярную клубочковую деменцию, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией (DNTC), таупатию белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI), лобно-височную лобарную дегенерацию с таупозитивными включениями (FTLD-tau). Таупатии также включают ненейродегенеративные заболевания, включая инфекционные заболевания, такие как последствия энцефалита Экономо и подострый склерозирующий панэнцефалит; и вызванные травмой состояния, такие как энцефалопатия боксеров.

Когнитивные расстройства определяются как тип интеллектуального нарушения, которое включает состояние, когда однажды развитая или приобретенная интеллектуальная функция снизилась ("New Psychiatry (Nankodo's Essential Well-Advanced Series)" (Японская книга), под редакцией Kunitoshi Kamijima and Shin-ichi Niwa, Nankodo Co., Ltd., 2008, p. 69-70), но считаются в широком смысле заболеваниями, проявляющими интеллектуальные нарушения и/или ухудшение памяти. При диагностике нейродегенеративных заболеваний, таких как БА, определяется, является ли состояние "нейродегенеративным", например, путем анализа того, существуют ли нейрофибриллярные клубки (NFT) посредством гистологического анализа после смерти, в то время как врачи диагностируют когнитивные расстройства, особенно такие, как нейродегенеративные заболевания, с использованием различных средств, например: нейропсихологических исследований с помощью обследований, таких как переработанная шкала деменции Хасегавы (HDS-R) и исследование мини-психического состояния (MMSE); нейропсихологических исследований посредством наблюдений, таких как оценка клинической деменции (CDR) или этап функциональной оценки (FAST); биохимических исследований, основанных, например, на повышении уровней тау и фосфорилированного тау или увеличении уровня Ap в спинномозговой жидкости; и визуальной оценки на основе информации, полученной, например, с помощью КТ головы, МРТ головы, СПЕКТ или ПЕТ. Терапевтический или профилактический агент от когнитивных расстройств в соответствии с данным изобретением вводится пациенту, у которого врач диагностировал когнитивное расстройство, и оказывает эффект улучшения состояния пациента по сравнению с состоянием перед введением, контроля прогрессирования состояния посредством введения или поддержания состояния на уровне, или восстановления состояния до уровня до введения на основании, по меньшей мере, одного из диагностических индексов нейродегенеративного заболевания.

Терапевтический или профилактический агент от когнитивных расстройств в соответствии с дан-

ным изобретением может также оказывать эффект улучшения когнитивной функции или ингибирования снижения когнитивной функции или поддержания когнитивной функции у человека или животного, не являющегося человеком. Примеры таких животных, отличных от человека, предпочтительно должны представлять собой животных, экспрессирующих тау, имеющего высокую гомологию с тау человека, и включают, но не ограничиваются ими: шимпанзе, макаку, лошадь, свинью, собаку, мышь, кролика, крысу и кошку.

Примеры

Пример 1: Получение антитела.

1. Антитело мыши (родительское антитело).

Мышиное антитело Ta1505 использовали в качестве родительского антитела для химерного антитела и гуманизированного антитела. Детали мышиного антитела Ta1505 описаны в примерах международной публикации № WO2013/180238A. Аминокислотная последовательность легкой цепи (L-цепи) антитела мыши Ta1505 определена в SEQ ID NO: 44, а нуклеотидная последовательность, кодирующая ее, определена в SEQ ID NO: 45. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (H-цепи) антитела мыши Ta1505 определена в SEQ ID NO: 46, а нуклеотидная последовательность, кодирующая ее, определена в SEQ ID NO: 47.

2. Химерное антитело.

Химерное антитело было получено путем объединения переменных областей легкой цепи (L-цепи) и тяжелой цепи (H-цепи) антитела мыши Ta1505 с, соответственно, константными областями L-цепи и H-цепи иммуноглобулина (Ig) G1 (κ) человека. Аминокислотная последовательность легкой цепи (L-цепи) химерного антитела определена в SEQ ID NO: 48, а нуклеотидная последовательность, кодирующая ее, определена в SEQ ID NO: 49. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (H-цепи) химерного антитела определена в SEQ ID NO: 50, а нуклеотидная последовательность, кодирующая ее, определена в SEQ ID NO: 51. Во всем описании это химерное антитело упоминается как "химерное антитело" или "химерное антитело Ta1505".

3. Гуманизированное антитело. Конструирование VL и VH.

Первичные последовательности, имеющие высокую гомологию, были отобраны из человеческой зародышевой линии, и гуманизация была осуществлена с помощью прививания определяющей комплементарности области (CDR) для конструирования множества гуманизированных антител.

Подробно, человеческие структуры, имеющие высокую гомологию, были отобраны из базы данных; область CDR мышиного антитела Ta1505 была вставлена в каждый из каркасов; и замены аминокислот проводили, например, для снижения иммуногенности при сохранении активности. Тем самым были сконструированы аминокислотные последовательности различных переменных областей легкой цепи (VL) и переменных областей тяжелой цепи (VH). Номера SEQ ID аминокислотных последовательностей VL и номера SEQ ID нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов приведены в табл. 2A, а номера SEQ ID аминокислотных последовательностей VH и нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов приведены в табл. 2B. Выравнивания аминокислотных последовательностей VL и VH показаны на фиг. 2A и фиг. 2B соответственно.

Таблица 2A
Варибельная область легкой цепи (VL)

Кодовое название	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
VL15	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33
VL36	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:35
VL46	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:37
VL47	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39
VL48	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41
VL50	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43

Таблица 2В
Вариабельная область тяжелой цепи (VH)

Кодовое название	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
VH11	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19
VH12	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
VH47	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23
VH61	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25
VH62	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27
VH64	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29
VH65	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31

Выбор комбинации VL и VH на основе оценки иммуногенности VL и VH, сконструированные с помощью описанной выше процедуры, объединяли произвольно, и показатель иммуногенности (показатель DRB1) каждой комбинации рассчитывали с помощью программного обеспечения для анализа *in vitro* Eribase (Lonza). Комбинации VL и VH, которые будут использоваться в последующих экспериментах, были выбраны из комбинаций, демонстрирующих низкую иммуногенность с показателями иммуногенности, равными или меньшими, чем заданное значение (показатель DRB1: 1500). Выбранные комбинации VL и VH приведены в табл. 3А, а показатели иммуногенности (показатель DRB1) этих комбинаций приведены в табл. 3В.

Таблица 3А
Выбранные комбинации VL и VH

		Вариабельная область тяжелой цепи (VH)						
		H11	H12	H47	H61	H62	H64	H65
Вариабельная область легкой цепи (VL)	L1	L15H1						
	5	1						
	L3	L36H1						
	6	1						
	L4	L46H1						
	6	1						
	L4	L47H1					L47H6	L47H6
7	1					4	5	
L4	L48H1	L48H1	L48H4	L48H6	L48H6	L48H6		
8	1	2	7	1	2	4		
L5	L50H1							
0	1							

Таблица 3В
Показатель иммуногенности (показатель DRB1)

		Вариабельная область тяжелой цепи (VH)						
		H11	H12	H47	H61	H62	H64	H65
Вариабельная область легкой цепи (VL)	L15	1495						
	L36	1437						
	L46	1463						
	L47	1333					1382	1426
	L48	1417	1352	1433	1383	1433	1466	
	L50	1475						

Экспрессионная культура и очистка гуманизированных антител.

Для каждой комбинации VL и VH, выбранной с помощью вышеописанной процедуры, были получены гены, кодирующие аминокислотные последовательности VL и VH. Ген VL был слит в рамке с геном константной области (CL) L-цепи каппа иммуноглобулина человека (ее аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность определены в SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53, соответственно), а ген VH был слит в рамке с геном константной области (CH) H-цепи гамма-1 иммуноглобулина человека (ее аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность определены в SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 55, соответственно), так что в каждом сайте связывания не должны возникать

мутация или дефект. 5'-концы гена VL и гена VH были слиты в рамке, соответственно, с сигнальной последовательностью, полученной из гена L-цепи каппа иммуноглобулина человека (ее аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность определены в SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57, соответственно), и сигнальной последовательностью, полученной из гена H-цепи гамма-1 иммуноглобулина человека (ее аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность определены в SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно), так что в каждом сайте связывания не должны возникнуть мутация или дефект.

Конструкции нуклеиновых кислот, кодирующие, соответственно, слитые с сигнальной последовательностью L- и H-цепи, сконструированные по вышеописанной методике, каждую включали в вектор экспрессии для экспрессии в клетках животных и затем культивировали с использованием ExpiCHO (производства Thermo Fisher Scientific KK) в соответствии со стандартным протоколом для экспрессии антител. Каждую культуру осветляли центрифугированием, и полученный супернатант культуры нанесли на аффинную колонку с белком А для очистки гуманизированного антитела. Фракцию, элюированную кислотным раствором, имеющим pH от 2,8 до 3,5, быстро нейтрализовали, концентрировали и нанесли на колонку для гель-фильтрации с целью удаления агрегата. Буфер был заменен на фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) для сбора основной фракции, которую разбавляли растворителем до соответствующей концентрации и затем использовали в следующих исследованиях.

В следующих описаниях название каждого гуманизированного антитела, полученного с помощью вышеописанной процедуры, может быть сокращено с использованием комбинации кодовых названий его VL и VH. Например, гуманизированное антитело, получаемое с использованием L15 в качестве VL и H11 в качестве VH, обозначают как L15H11.

В следующих исследованиях 3% БСА/PBS использовали в качестве растворителя для корректировки концентрации антитела, если не указано иное.

Пример 2: Твердофазный ИФА аффинности связывания антигенного пептида.

1. Твердофазный ИФА аффинности связывания с антигенным пептидом.

Некоторые из гуманизированных антител, имеющих комбинации VL и VH, приведенные в табл. 3А, анализировали в отношении аффинности связывания с антигенным пептидом с помощью иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА).

Нефосфорилированный тау-пептид PD17 (Ser413) и фосфорилированный тау-пептид PD17P (pSer413), в котором Ser413 был фосфорилирован, каждый разбавляли охлажденным PBS до 1 мкг/мл, и каждый из полученных растворов распределяли в планшет при 50 мкл/лунку и оставляли при 4°C в течение ночи. Раствор удаляли и затем распределяли блокирующий буфер (3% бычий сывороточный альбумин (BCA)-PBS) при 270 мкл/лунку, и планшет оставляли стоять при 4°C в течение ночи. После того как раствор был удален, раствор антитела постепенно разбавляли 3% БСА-PBS и затем добавляли в планшет в количестве 50 мкл/лунку, чтобы обеспечить возможность прохождения реакции при комнатной температуре в течение 90 минут. Аминокислотные последовательности нефосфорилированного тау-пептида PD17 (Ser413) и фосфорилированного тау-пептида PD17P (pSer413) определены в SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 8, соответственно.

Каждую лунку промывали трис-буферным солевым раствором с Tween 20 (TBS-T), который содержит 0,05% Tween 20. Козий анти-человеческий IgG, меченый щелочной фосфатазой (производства Sigma-Aldrich Co. LLC.), разбавленный в 2000 раз буфером для разведения (3% БСА-PBS), добавляли в планшет при 50 мкл/лунку, чтобы обеспечить возможность прохождения реакции при комнатной температуре в течение 60 минут. После промывания TBS-T, хромогенный раствор (1 мг/мл раствора п-нитрофенилфосфата (pNPP)) добавляли в планшет при 100 мкл/лунку для проявления цвета в течение 40 минут. Поглощение (значение оптической плотности (ОП)) измеряли при длине волны, равной 405 нм.

Реакционную способность оценивали, определяя отношение значения ОП каждого антитела к значению ОП 0,25 нМ химерного антитела и оценивая полученное соотношение по следующей трехбалльной шкале:

- + : достаточная реактивность ($0,6 \leq$ отношение ОП),
- ± : очень слабая реактивность ($0,15 <$ отношение ОП $< 0,6$), и
- : нет реактивности (отношение ОП $\leq 0,15$).

В табл. 4А показаны результаты оценки реактивности антител с фосфорилированным тау-пептидом PD17P. В табл. 4В показаны результаты оценки реактивности антител с нефосфорилированным тау-пептидом PD17. По сравнению с химерным антителом все гуманизированные антитела проявляли более высокую реакционную способность с фосфорилированным тау-пептидом PD17P, но более низкую реакционную способность с нефосфорилированным тау-пептидом PD17. Эти результаты демонстрируют, что гуманизированные антитела обладают селективной реактивностью с фосфорилированным тау-пептидом.

Таблица 4А

Твердофазный ИФА реакционной способности с фосфорилированным пептидом PD17P

		Вариабельная область тяжелой цепи (VH)						
		VH11	VH12	VH47	VH61	VH62	VH64	VH65
Вариабельная область легкой цепи (VL)	VL15	+						
	VL36	+						
	VL46	+						
	VL47							+
	VL48	+	+	+	+	+	+	
	VL50	+						

Таблица 4В

Твердофазный ИФА реакционной способности с нефосфорилированным пептидом PD17

		Вариабельная область тяжелой цепи (VH)						
		VH11	VH12	VH47	H61	VH62	VH64	VH65
Вариабельная область легкой цепи (VL)	VL15	-						
	VL36	-						
	VL46	-						
	VL47							-
	VL48	-	-	-	-	-	-	
	VL50	-						

2. Твердофазный ИФА аффинности селективного связывания с фосфорилированным тау-пептидом.

Некоторые из гуманизированных антител, имеющих комбинации VL и VH, приведенные в табл. 3А, были проанализированы в отношении селективной аффинности связывания гуманизированных антител против тау с фосфорилированным тау-пептидом с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) с использованием химерного антитела Ta1505 в качестве эталонного антитела.

Раствор, содержащий 1 мкг/мл нефосфорилированного пептида PD17 или фосфорилированного пептида PD17P, помещали в планшет при 50 мкл/лунку и оставляли стоять при 4°C в течение ночи. После удаления раствора блокирующий буфер (3% бычьего сывороточного альбумина (BCA)-PBS) дозировали при 270 мкл/лунку, и планшет оставляли стоять при 4°C в течение ночи, чтобы тем самым получить планшеты, в которых нефосфорилированный пептид PD17 или фосфорилированный пептид PD17P был иммобилизован в каждой лунке.

Ряд из пяти концентраций каждого антитела готовили 4-кратным серийным разведением, начиная с начальной концентрации, равной 0,6 мкг/мл (4 нМ). Каждый раствор добавляли в лунку планшетов при 50 мкл/лунку, чтобы обеспечить прохождение реакции при комнатной температуре в течение одного часа. После процесса промывки козий анти-человеческий IgG, меченый щелочной фосфатазой (производства Sigma-Aldrich Co. LLC.) разводили в 2000 раз, а затем добавляли в каждую лунку при 50 мкл/лунку, чтобы дополнительно провести реакцию в течение одного часа.

После процесса промывки в каждую лунку добавляли раствор п-нитрофенилфосфата (pNPP) 1 мг/мл при 100 мкл/лунку, для проведения реакции в течение 20 минут. Поглощение (ОП) измеряли при длине волны, равной 405 нм.

Данные оптической плотности (ОП) при соответствующих концентрациях каждого полученного антитела анализировали с помощью программного обеспечения SoftMax Pro версии 6,5 (Molecular Devices Corporation), чтобы определить следующие числовые значения от А до D, которые были приписаны четырехпараметрической кривой логистической регрессии, показанной ниже:

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \quad (\text{Уравнение 1})$$

где x представляет концентрацию антитела,

y представляет поглощение (значение ОП).

Значение поглощения ОП нефосфорилированного пептида PD17 в концентрации 1 нМ вносили в уравнение для расчета концентрации x каждого антитела, соответствующей величине оптической плотности. Поскольку концентрация PD17 составляла 1 нМ, масштабный коэффициент аффинности связывания с фосфорилированным тау-пептидом PD17P, основанный на аффинности связывания с PD17 для каждого пептида, рассчитывали как 1/x и использовали в качестве показателя аффинности селективного связывания с фосфорилированным тау-пептидом.

Результаты показаны на графике фиг. 3. Аффинность связывания химерного антитела Ta1505 с

фосфорилированным тау-пептидом PD17P была в 30 раз сильнее, чем у нефосфорилированного пептида PD17. Напротив, селективная аффинность связывания в гуманизованных антителах проявляла высокую селективность с масштабным коэффициентом от 40 до 210 раз. Результаты показывают, что гуманизованные антитела обладают специфической аффинностью связывания с фосфорилированным пептидом.

3. Твердофазный ИФА аффинности селективного связывания с сайтом фосфорилирования Ser413 с использованием фосфорилированного тау-пептида.

Гуманизованные антитела, имеющие комбинации VL и VH, приведенные в табл. 3А, каждое анализировали в отношении его способности селективно связываться с сайтом фосфорилирования Ser413 среди основных сайтов фосфорилирования белка с помощью твердофазного ИФА с использованием различных фосфорилированных пептидов.

Использовали двенадцать фосфорилированных пептидов, как показано в табл. 5. В столбце под названием "эпитоп" указан фосфорилированный(е) сайт(ы) тау-белка 4R2N-типа (например, "pS46" в пептиде № 1 указывает, что сайт Ser46 является фосфорилированным эпитопом, а описания нескольких эпитопов указывают, что один пептид имеет два или три сайта фосфорилирования), за исключением того, что пептид № 12 имеет эпитоп, содержащий сайт Ser413, но не являющийся фосфорилированным (PD17).

Таблица 5

Пептид для анализа специфического связывания с сайтом фосфорилирования тау-белка Ser413

Пептид №	Эпитоп	Аминокислотная последовательность (однобуквенный код)	SEQ ID NO:
1	pS46	H-GLKE (pS) PLQT-OH	61
2	pS199	H-SGYS (pS) PGSPGC-OH	62
3	pS202	H-SSPG (pS) PGTPC-OH	63
4	pT212/pS214	H-GCGSPGTPGSRSR (pT) P (pS) LPTPPTREPK-OH	64
5	pT217	H-GC-GSRRTPSLP (pT) PPTREPKKVAVV-OH	65
6	pT231	H-KVAVVR (pT) PPKSPS-OH	66
7	pS396/pS400/pS404	H-GC-RENAKAKTDHGAEIVYK (pS) PVV (pS) GDT (pS) PRHL-OH	67
8	pS412	H-NV (pS) STGSC-OH	68
9	pS412/pS413	H-PRHLSNV (pS) (pS) TGSIDMVD-OH	7
10	pS413	H-PRHLSNVS (pS) TGSIDMVD-OH (PD17P)	8
11	pS409/pS412/pS413	H-PRHL (pS) NV (pS) (pS) TGSIDMVD-OH	9
12	S413	H-PRHLSNVSTGSIDMVD-OH (PD17)	69

Двенадцать пептидов, приведенных в табл. 5, то есть пептиды с 1 по 12, или конъюгаты этих пептидов с бычьим сывороточным альбумином (БСА) или гемоцианином лимфы улитки (КЛН), каждый разбавляли PBS, охлажденным до 4°C, до 1 мкг/мл, и полученный раствор распределяли по планшетам в количестве 50 мкл/лунку и оставляли стоять при 4°C в течение ночи. Раствор удаляли и затем распределяли блокирующий буфер (3% БСА-PBS) при 270 мкл/лунку, и планшет оставляли стоять при 4°C в течение ночи. После удаления раствора очищенное антитело разбавляли 3% БСА-PBS до 150 нг/мл, а затем добавляли в планшет при 50 мкл/лунку, чтобы обеспечить возможность прохождения реакции при комнатной температуре в течение 90 минут. Каждую лунку промывали трис-буферным солевым раствором (TBS-T), содержащим 0,05% Tween 20. Козий анти-человеческий IgG (H+L)-, меченый щелочной фосфатазой (производства Sigma-Aldrich Co. LLC.), разбавленный в 2000 раз буфером для разведения (3% БСА-PBS), добавляли в планшет при 50 мкл/лунку, чтобы обеспечить возможность прохождения реакции при комнатной температуре в течение 60 минут. После промывания TBS-T, хромогенный раствор (1 мг/мл раствора pNPP) добавляли в планшет при 100 мкл/лунку для развития цвета в течение 40 минут. Поглощение (значение ОП) измеряли при длине волны измерения, равной 405 нм и эталонной длине волны, равной 550 нм.

Реакционную способность оценивали по следующей трехбалльной шкале:

+: достаточная реактивность ($1,0 \leq$ значение ОП),

±: очень слабая реактивность ($0,5 \leq$ значение ОП < 1,0), и

-: нет реактивности (значение ОП < 0,5).

Результаты представлены в табл. 6. Все гуманизированные антитела показали сильную аффинность связывания только с пептидом № 9 (pSer412/pSer413:PRHLSNV(pS)(pS)TGSIDMVD), пептидом № 10 (pSer413:PRHLSNV(pS)TGSIDMVD) и пептидом № 11 (pSer409/pSer412/pSer413:PRHL(pS)NV(pS)(pS)TGSIDMVD), но не связывались с другими пептидами, у которых сайт, соответствующий Ser413 белка тау, не был фосфорилирован. Характер и сила связывания были практически такими же, как у химеры (химерное антитело Та1505). Эти результаты показывают, что гуманизированные антитела обладают аффинностью связывания, специфичной для белка тау, имеющего фосфорилированный сайт Ser413.

Таблица 6

Результаты твердофазного ИФА реактивности с различными фосфорилированными тау-пептидами

Антитело	№ пептида в таблице 5											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
химера	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L15H11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L36H11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L46H11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L47H11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L48H11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L50H11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L48H12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L48H47	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L48H61	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L48H62	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L47H64	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L48H64	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L47H65	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

Пример 3: Твердофазный ИФА аффинности связывания с антигенным белком.

Некоторые из гуманизированных антител, имеющих комбинации VL и VH, приведенные в табл. 3А, анализировали в отношении аффинности связывания с антигенным белком с помощью твердофазного ИФА.

Чтобы получить фосфорилированный тау-белок рТau, тау-белок 4R2N экспрессировали в клетках насекомых с использованием бакуловирусной системы. Кроме того, для получения гиперфосфорилированного тау-белка hrТau был получен рекомбинантный бакуловир, способный одновременно экспрессировать тау-белок и GSK3β.

При получении рекомбинантного бакуловируса использовали векторы pFastBac1 и pFastBac Dual. Для фосфорилированного тау-белка рТau в pFastBac1 была встроена кДНК, кодирующая тау-белок 4R2N, имеющий His-меченный С-конец. Для гиперфосфорилированного тау-белка hrТau в pFastBac Dual вставляли кДНК, кодирующую тау-белок 4R2N, имеющий His-меченный С-конец, и кДНК, кодирующую GSK3β. Аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность His-меченого тау-белка 4R2N определены в SEQ ID NO: 70 и 71, соответственно. Аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность GSK3β определены в SEQ ID NO: 72 и 73, соответственно.

Полученные векторы каждый вводили в клеточную линию Sf9 путем липофекции, и клетки культивировали для получения рекомбинантных бакуловирусов. Полученные рекомбинантные бакуловирусы затем использовали для инфицирования клеточной линии Sf9 или Tn5, чтобы тем самым экспрессировать фосфорилированный тау-белок (рТau) и гиперфосфорилированный тау-белок (hrТau).

Клетки, экспрессирующие желаемый белок, собирали и подвергали ультразвуковой обработке и центрифугированию для получения клеточного лизата, который затем наносили на колонку Ni-NTA для очистки тау-белка. Концентрацию очищенного тау-белка определяли в анализе бицинхониновой кислоты (BCA), используя бычий сывороточный альбумин (BCA) в качестве стандартного образца.

Полученный гиперфосфорилированный тау-белок (hrТau) и фосфорилированный тау-белок (рТau) разбавляли охлажденным PBS до 1 мкг/мл, и разбавленные растворы распределяли по планшету при 50 мкл/лунку и оставляли стоять при 4°C в течение ночи. После того как растворы были удалены, блокирующий буфер (3% БСА-PBS) затем дозировали при 270 мкл/лунку, и планшет оставляли стоять при 4°C в течение ночи. После удаления буферного раствора серию растворов антител, приготовленных путем серийного разбавления 3% БСА-PBS, добавляли в планшет в количестве 50 мкл/лунку, чтобы обеспечить возможность прохождения реакции при комнатной температуре в течение 90 минут.

Лунки затем промывали трис-буферным солевым раствором (TBS-T), содержащим 0,05% Tween 20.

Козий античеловеческий IgG, меченый щелочной фосфатазой (производства Sigma-Aldrich Co. LLC.), разбавленный в 2000 раз буфером для разведения (3% БСА-PBS), добавляли в планшеты при 50 мкл/лунку, чтобы обеспечить возможность прохождения реакции при комнатной температуре в течение 60 минут. После промывания TBS-T, хромогенный раствор (1 мг/мл раствора pNPP) добавляли в планшет при 100 мкл/лунку для проявления цвета в течение 40 минут. Поглощение (значение ОП) измеряли при длине волны, равной 405 нм.

Реакционную способность оценивали, определяя отношение значения ОП каждого антитела к значению ОП 0,25 нМ химерного антитела и оценивая полученное соотношение по следующей трехбалльной шкале:

- +: достаточная реактивность ($0,6 \leq$ отношение ОП),
- ±: очень слабая реактивность ($0,15 <$ отношение ОП $< 0,6$), и
- : нет реактивности (отношение ОП $\leq 0,15$).

В табл. 7А приведены результаты оценки реактивности гуманизованных антител с гиперфосфорилированным тау-белком hrTau. В табл. 7В приведены результаты оценки реактивности гуманизованных антител с фосфорилированным тау-белком pTau. Результаты показывают, что все гуманизованные антитела обладают высокой реакционной способностью как с гиперфосфорилированным тау-белком hrTau, так и с фосфорилированным тау-белком pTau по сравнению с химерным антителом.

Таблица 7А

Результат твердофазного ИФА реактивности с гиперфосфорилированным тау-белком hrTau

	VH11	VH12	VH47	VH61	VH62	VH64	VH65
VL15	+						
VL36	+						
VL46	+						
VL47							+
VL48	+	+	+	+	+	+	
VL50	+						

Таблица 7В

Результат твердофазного ИФА реактивности с фосфорилированным тау-белком pTau

	VH11	VH12	VH47	VH61	VH62	VH64	VH65
VL15	+						
VL36	+						
VL46	+						
VL47							+
VL48	+	±	+	+	+	+	
VL50	+						

Пример 4: Анализ аффинности связывания ППР.

Некоторые из гуманизованных антител, имеющих комбинации VL и VH, приведенные в табл. 3А, подвергали анализу аффинности связывания с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием химерного антитела Ta1505 в качестве эталонного антитела.

Гиперфосфорилированный тау-белок 4R2N (hrTau: см. пример 3) использовали в качестве белка-антигена, а нефосфорилированный тау-белок продуцировали с помощью *Escherichia coli* (Tau: His-меченный нефосфорилированный тау-белок 4R0N: ATGen Co. Ltd., кат. №: ATGP0795) использовали в качестве отрицательного контроля. В качестве антигенных пептидов использовали монофосфорилированный тау-пептид (1×p), в котором только Ser413 был фосфорилирован, и трифосфорилированный тау-пептид (3×p), в котором Ser409 и Ser412 были дополнительно фосфорилированы в дополнение к Ser413. Аминокислотные последовательности этих пептидов приведены в табл. 8. Используемый пептид отрицательного контроля представлял собой нефосфорилированный тау-пептид (Non P), аминокислотная последовательность которого также приведена в табл. 8. Аминокислотная последовательность His-меченного нефосфорилированного тау-белка 4R0N определена в SEQ ID NO: 74. Аминокислотные последовательности монофосфорилированного тау-пептида 1×p, трифосфорилированного тау-пептида 3×p и нефосфорилированного тау-пептида Non P определены в SEQ ID NO: 75, 76 и [77], соответственно.

Таблица 8
Антигенный пептид, используемый в SPR

Кодовое название	Аминокислотная последовательность (однобуквенный код)	SEQ ID NO:
1×P	TSPRHLSNVS (pS) TGSIDMVDSPC	75
3×P	TSPRHL (pS) NV (pS) (pS) TGSIDMVDSPC	76
Без P	TSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPC	77

Аффинность связывания гиперфосфорилированного тау-белка 4R2N (hpTau), нефосфорилированного тау-белка 4R0N, монофосфорилированного тау-пептида 1×P, трифосфорилированного тау-пептида 3×P и нефосфорилированного тау-пептида Non P с каждым антителом измеряли с помощью ППП-системы Biacore T200 (GE Healthcare Japan), в соответствии с инструкцией по оценке, прилагаемой к системе.

Аффинность связывания измеряли способом, включающим: приготовление сенсорного чипа NTA (включая слой карбоксиметилдекстрана, на котором уже иммобилизована нитрилтриуксусная кислота (NTA): код № BR-1005-32); иммобилизацию каждого из вышеупомянутых пептидов, слитых с His-меткой, и каждого из антигенных пептидов, приведенных в таблице 8, на сенсорном чипе ковалентными связями посредством реакции аминного сочетания с использованием набора для аминного сочетания (GE Healthcare Japan, код № BR-1006-33); и измерение кинетики связывания антител с иммобилизованными белками и пептидами.

Каждый из белков hpTau или тау с His-меткой иммобилизовали на сенсорном чипе, используя буфер HBS-N (код № BR-1003-69) в качестве раствора реакции иммобилизации и позволяя раствору хлорида никеля реагировать с сенсорным чипом NTA для связывания Ni с NTA. Затем сенсорный чип активировали смешанным раствором гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимид (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидгидрохлорида: EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS). Раствор каждого из His-меченых белков, доведенный до концентрации от 100 до 500 нг/мл буфером 4-(2-гидроксипропил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES) (0,01 M HEPES, 150 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM ЭДТА, pH 7,2), наносили на сенсорный чип, в результате чего белок был иммобилизован на сенсорном чипе через ковалентные связи с Ni-NTA. Оставшуюся активную NHS блокировали этаноламином, и ионы Ni удаляли раствором ЭДТА (связывание аффинности амина с Ni: см. международную публикацию № WO2005/022156). Антигенные пептиды (1×P, 3×P и Non P) были иммобилизованы на сенсорном чипе путем активации сенсорного чипа NTA смешанным раствором N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимид (EDC) гидрохлорида и N-гидроксисукцинимид (NHS), а затем наносили раствор антигенного пептида, разбавленного 10 mM натрий-ацетатным буфером (pH: 4-4,5) до 1-10 мкМ на сенсорный чип, посредством чего пептид был ковалентно связан с сенсорным чипом. Оставшийся активный NHS блокировали этаноламином. Таким образом, были получены сенсорные чипы, иммобилизованные соответственно белками и пептидами, упомянутыми выше.

Буфер CAPS (pH 10,5) наносили на эти сенсорные чипы при 37°C для стабилизации иммобилизованных белков или пептидов на поверхностях сенсорных чипов. Раствор каждого антитела, приготовленный с буфером HEPES (pH 7,2) в качестве раствора для реакции специфического связывания, наносили на поверхность сенсорного чипа в концентрациях от 0,2 до 1 nM (около расчетной константы диссоциации связывания [KD]) в течение 150 секунд (одинаковые в рамках одной оценки) для реакции и измеряли кинетику связывания. Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Biacore для анализа (Biacore T200 Evaluation Software, версия 3.0).

Кинетику связывания каждого антитела корректировали путем вычитания кинетики связывания нефосфорилированного белка 4R0N с сенсорным чипом в качестве отрицательного контроля из кинетики связывания антигенного белка 4R2N (hpTau) с сенсорным чипом. Кинетику связывания каждого антигенного пептида корректировали путем вычитания кинетики связывания нефосфорилированного пептида Non P с сенсорным чипом в качестве отрицательного контроля из кинетики связывания каждого из пептидов антигена 1×P и 3×P. Никакого связывания каждого антитела с нефосфорилированным тау-белком 4R0N или нефосфорилированным пептидом Non P в диапазоне концентраций образца, подвергаемых измерению, не наблюдалось.

В табл. 9А приведена активность связывания гуманизированных антител с фосфорилированным тау-белком 4R2N (hpTau). В табл. 9В приведены результаты активности связывания гуманизированных антител с монофосфорилированным тау-пептидом 1×P и трифосфорилированным тау-пептидом 3×P. Результаты демонстрируют, что каждое гуманизированное антитело проявляло высокую активность связывания со всеми из гиперфосфорилированного тау-белка hpTau, монофосфорилированного тау-пептида 1×P и трифосфорилированного тау-пептида 3×P.

Таблица 9А

Активность связывания гуманизированных антител с фосфорилированным тау-белком (hpTau) (модель связывания 1:1)

Образец	hpTau KD (M)
химера	1,70E-10
L15H11	1,50E-10
L36H11	1,40E-10
L46H11	1,30E-10
L47H11	1,80E-10
L48H12	1,60E-10
L48H47	1,40E-10
L48H64	1,00E-10
L47H65	1,50E-10
L48H11	1,40E-10
L48H61	1,70E-10
L48H62	1,30E-10
L50H11	1,50E-10

Таблица 9В

Активность связывания гуманизированных антител с фосфорилированными пептидами (1×P, 3×p) (модель связывания 1:1)

Образец	1×P	3×P
	KD (M)	KD (M)
химера	4,60E-11	2,20E-11
L15H11	3,90E-11	1,90E-11
L36H11	4,70E-11	1,90E-11
L46H11	4,80E-11	1,70E-11
L47H11	6,20E-11	2,20E-11
L48H12	6,50E-11	2,70E-11
L48H47	5,80E-11	2,20E-11
L48H64	5,00E-11	1,50E-11
L47H65	5,40E-11	1,90E-11
L48H11	6,00E-11	2,00E-11
L48H61	1,80E-10	2,40E-11
L48H62	5,20E-11	2,00E-11
L50H11	4,80E-11	1,90E-11

Пример 5: Анализ аффинности связывания pSer413-Tau в гомогенате мозга пациента с БА.

Среди гуманизированных антител, имеющих комбинации VL и VH, приведенные в табл. 3А, L15H11, L46H11 и L47H65 были оценены в отношении аффинности связывания с фосфорилированным тау-белком Ser413 (pSer413-Tau), полученным из клинического образца пациента с болезнью Альцгеймера (БА), в жидкой фазе, с использованием мышинового антитела Ta1505 и химерного антитела в качестве эталонных антител.

Гуманизированные антитела, антитела мыши и химерные антитела были биотинилированы с использованием N-гидроксисукцинимид-LC-биотина (NHS-LC-биотин) (Thermo Fisher Scientific К.К.) с последующим диализом с помощью PBS.

Замороженную ткань гиппокампа (160 мг) из головного мозга пациента с БА на стадии V/VI Браака добавляли к 0,8 мл TBS-I (трис-буферный солевой раствор, коктейль с ингибитором протеазы, коктейль с ингибитором фосфатазы) и обрабатывали ультразвуком в ледяной воде. Обработанный ультразвуком раствор центрифугировали при 3000×g при 4°C в течение 10 минут, и супернатант собирали и дополнительно ультрацентрифугировали при 100000×g при 4°C в течение 15 минут для получения гомогената мозга. Набор Innostest pTau (pT181) (Fjirebio Inc.) использовали в качестве системы твердофазного ИФА фосфорилированного тау-белка Ser413 (pSer413-Tau), но биотинилированное антитело, включенное в набор (помеченное как CONJ1), было заменено биотинилированными антителами, полученными выше.

Каждое из биотинилированных антител, полученных выше, превращали в раствор с концентрацией 0,1 нМ и добавляли в иммобилизованный МТ-планшет HT7 (включенный в набор) вместе с 1000-

кратным разведением гомогената мозга. Полученный образец перемешивали и инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день планшет промывали и в планшет добавляли меченный HRP стрептавидин (включенный в набор как CONJ2) с последующей инкубацией в течение одного часа. После промывки добавляли красящий реагент ТМВ с последующей инкубацией с защитой от света при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем реакцию останавливали с помощью раствора ограничителя реакции (включенного в набор в качестве раствора STOP) и измеряли оптическую плотность при длине волны, равной 450 нм.

Результаты представлены на фиг. 4. Как показано на графике на фиг. 4, все гуманизированные антитела L15H11, L46H11 и L47H65 проявляют высокую аффинность связывания с фосфорилированным тау-белком Ser413 (pSer413-Tau), полученным из клинического образца пациента с БА.

Пример 6: Исследование кинетики в крови.

Пять исходных вариантов гуманизированных антител были исследованы в отношении фармакокинетики у нормальных мышей по сравнению с коммерчески доступным антителом герцептин (Genentech, южный Сан-Франциско, штат Калифорния) и химерным антителом Ta1505. Легкая цепь и тяжелая цепь каждого варианта гуманизированного антитела приведены в табл. 10 ниже.

Таблица 10

Легкая цепь и тяжелая цепь некоторых исходных вариантов гуманизированных антител

Антитело	LC	HC
Вариант 2	L1 (SEQ ID NO:130)	H2 (SEQ ID NO:134)
Вариант 5	L2 (SEQ ID NO:131)	H1 (SEQ ID NO:133)
Вариант 6	L2 (SEQ ID NO:131)	H2 (SEQ ID NO:134)
Вариант 9	L3 (SEQ ID NO:132)	H1 (SEQ ID NO:133)
Вариант 10	L3 (SEQ ID NO:132)	H2 (SEQ ID NO:134)

Антитела вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг 11-недельным самцам мышей C57BL/6J (Charles River Laboratories Japan, Inc.). Плазма была получена из крови, собранной через 1, 3, 8, 24 и 72 часа после введения дозы. Размер выборки составлял 2 животных на антитело.

Сэндвич-ИФА с поликлональными антителами против IgG человека использовали для определения концентрации антител в плазме. Калибровочную кривую строили путем серийного разбавления каждого антитела мышинной плазмой.

Плазму разбавляли в 1000 раз и измеряли концентрацию антител.

1 мкг/мл раствора PBS поликлональных козьих античеловеческих антител IgG (Fc) пипеткой переносили в 96-луночный планшет (MaxSorp (NUNC)) и оставляли стоять при 4°C в течение ночи. Затем проводили блокирование 3% БСА/PBS для приготовления планшета с иммобилизованными козьими поликлональными античеловеческими антителами IgG (Fc). Мышиную плазму использовали для серийного разбавления антител и получения стандартного вещества. Плазму и стандартное вещество разводили 3% БСА/PBS и пипетировали в планшет с иммобилизованными козьими поликлональными античеловеческими антителами IgG (Fc) из расчета 50 мкл/лунку. Смеси давали прореагировать при комнатной температуре в течение 1,5 часов, и планшет затем промывали TBS-T (TBS, 0,05% Твин 20). Затем раствор, приготовленный разбавлением меченных щелочной фосфатазой поликлональных антител против человеческого IgG (H+L) (Southern Biotech, кат № 2087-04) в 2000 раз, с 3% БСА/PBS, пипетировали при 50 мкл/лунку и обеспечивали протекание реакции в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшет промывали TBS-T, добавляли красящий реагент при 100 мкл/лунку и планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого использовали ридер планшетов для измерения поглощения при 405 нм и 550 нм.

Калибровочную кривую строили со стандартным веществом и использовали для расчета концентрации антител в плазме. Результаты проиллюстрированы на фиг. 5А.

Первоначально исследованные гуманизированные варианты (варианты 2, 5, 6, 9 и 10) показали быстрое снижение концентрации в плазме через 8 часов после введения по сравнению с уровнем герцептина и химерного антитела, который оставался высоким и стабильным до 3 суток после инъекции. Эти исходные гуманизированные антитела имели более короткий период полужизни и плохой ФК-профиль по сравнению с химерным антителом, что, вероятно, связано с высокими значениями pI этих вариантов. Дополнительное улучшение требовалось для достижения ФК химерного антитела.

Среди гуманизированных антител, имеющих комбинации VL и VH, приведенные в табл. 3А, L15H11, L4 6H11 и L4 7H65 были подвергнуты исследованию кинетики в крови. Используемыми эталонными антителами были химерное антитело Ta1505 и известные гуманизированные антитела, использованные в клинических испытаниях для лечения БА, которые были получены путем рекомбинантной экспрессии на основе информации об аминокислотной последовательности, раскрытой в патентной информации или в информации баз данных. В частности, база данных международной информационной системы ImMunoGeneTics (зарегистрированный товарный знак) (IMGT) (<http://www.imgt.org>) была указана для соланезумаба (антитело против A β , Eli Lilly and Company); аминокислотную последовательность

VH2Vк3, раскрытая в WO2014/200921 A1, использовали для IPN007 (N-концевое антитело против Tau, Bristol-Myers Squibb iPierian); и аминокислотную последовательность VH32VL21, раскрытую в WO 2015/091656A1, использовали для MAb3221 (антитело против Tau-pS422, Roche Diagnostics K.K.).

Каждое из антител вводили внутривенно самцам мышей C57BL/6J в возрасте 11 недель (Charles River Laboratories Japan, Inc.) в концентрации 10 мг/кг каждое. Кровь брали через 1, 3, 8 и 24 часа, а затем на 3 и 7 сутки после введения для сбора плазмы. Каждое антитело было протестировано в трех повторностях (N=3).

Концентрацию антитела в плазме измеряли с помощью сэндвич-ИФА с использованием поликлонального анти-человеческого антитела. В частности, раствор PBS, содержащий 1 мкг/мл козьего анти-человеческого поликлонального антитела IgG (Fc) (Southern Biotech), добавляли в 96-луночный планшет (Max Sorp (NUNC)) для иммобилизации при 4°C в течение ночи с последующим блокированием с 3% БСА-PBS, чтобы таким образом получить планшет иммобилизованного козьего анти-человеческого поликлонального антитела IgG (Fc).

Отдельно ряд стандартных образцов антител известных концентраций готовили путем серийного разведения каждого антитела плазмой, взятой у мыши, которой антитело не вводили, и измеряли для получения калибровочной кривой.

Образцы плазмы и стандартные образцы, подлежащие измерению, разбавляли в 10000 раз и добавляли в планшет с иммобилизованным козьим анти-человеческим поликлональным антителом IgG (Fc), при 50 мкл/лунку для реакции при комнатной температуре в течение одного часа и 30 минут, и планшет затем промывали TBS-T (трис-буферный солевой раствор, 0,05% Tween 20). Впоследствии раствор меченного щелочной фосфатазой античеловеческого поликлонального антитела IgG (H+L) (Southern Biotech), разбавленного в 2000 раз 3% БСА-PBS, добавляли в планшет при 50 мкл/лунку, чтобы обеспечить прохождение реакции при комнатной температуре в течение одного часа. После промывания TBS-T, хромогенный раствор (1 мг/мл раствора pNPP) добавляли в планшет при 100 мкл/лунку с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение одного часа. Затем измеряли поглощение с помощью планшет-ридера при длине волны измерения, равной 405 нм и эталонной длине волны, равной 550 нм.

Калибровочная кривая была подготовлена на основе результатов измерения стандартных образцов, и концентрация антител в каждом образце плазмы была рассчитана с использованием калибровочной кривой.

Фиг. 5B представляет собой график, показывающий изменения концентрации антител в плазме с течением времени. Как видно из графика, гуманизированные антитела L15H11 (LC SEQ ID NO: 32 HC SEQ ID NO: 18), L46H11 (LC SEQ ID NO: 36, HC SEQ ID NO: 18), и L47H65 (LC SEQ ID NO: 38, HC SEQ ID NO: 30) (все используют IgG1 человека (SEQ ID NO: 135) и каппа человека (SEQ ID NO: 79) показали практически такую же кинетику в крови, как и у химерного антитела Ta1505. Кинетика этих гуманизированных антител L15H11, L46H11 и L47H65 в крови была сопоставима с таковой у известных гуманизированных антител IPN007 и MAb3221 и значительно превосходила таковую у известного гуманизированного антитела соланезумаба.

Пример 7: Анализ интрацеребральной миграции.

Было проведено исследование для анализа концентрации гуманизированных вариантов в мозге с улучшенной фармакокинетикой в плазме.

Кровь собирали у мышей, которым инъецировали родительское антитело мыши, химерное антитело или варианты гуманизированного антитела (L15H11, L36H11, L46H11, L48H12, L48H47, L48H64, L47H65 или L48H11) через 1 неделю после введения антител. Затем животных анестезировали смесью 3 анестетиков, лапаротомизировали и обескровливали через брюшную аорту. Затем собирали ткани мозга. Эту собранную ткань мозга разделяли на левое и правое полушария, замораживали на сухом льду/этаноле и хранили при -80°C. Каждое замороженное полушарие взвешивали и переносили в пробирку объемом 2 мл. Затем добавляли 0,8 мл TBS-I (трис-буферный солевой раствор, коктейль с ингибитором протеазы и коктейль с ингибитором фосфатазы) и смесь обрабатывали ультразвуком в ледяной воде. Обработанную ультразвуком смесь центрифугировали при 3000×g и 4°C в течение 10 минут и собирали супернатант. Супернатант дополнительно центрифугировали при 10000×g и 4°C в течение 15 минут для получения гомогената мозга.

10 мкг/мл раствора PBS поликлональных козьих античеловеческих антител IgG (Fc) пипеткой переносили в 96-луночный планшет (MaxSorp (NUNC)) и оставляли стоять при 4°C в течение ночи. Затем проводили блокирование 3% БСА/PBS для приготовления планшета с иммобилизованными козьими поликлональными античеловеческими антителами IgG (Fc). Гомогенат мозга, полученный от мышей, которым не вводили антитела, использовали для серийного разбавления антител и получения стандартного вещества.

Гомогенат мозга и стандартное вещество разводили в 10 раз пипетировали в планшет с иммобилизованными козьими поликлональными анти-человеческими антителами IgG (Fc) из расчета 50 мкл/лунку. Смеси давали прореагировать при комнатной температуре в течение 2 часов, и планшет затем промывали TBS-T (TBS, 0,025% Твин 20). Затем раствор, приготовленный разбавлением меченных щелочной фос-

фатазой поликлональных антител против человеческого IgG (H+L) (Sigma, кат. № SAB3701337-1MG) в 2000 раз, с 3% БСА/PBS, пипетировали при 50 мкл/лунку и обеспечивали прохождение реакции в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшет промывали TBS-T, добавляли красящий реагент pNPP (Sigma, кат. № P7998) при 100 мкл/лунку и планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого использовали ридер планшетов для измерения поглощения при 405 нм и 550 нм.

Калибровочную кривую строили со стандартным веществом и использовали для расчета концентрации антител в гомогенате мозга. Определяли концентрацию антител на массу мозга (объем всего мозга) и рассчитывали отношение к концентрации в плазме.

Фиг. 6А демонстрирует, что варианты гуманизированных антител с хорошей фармакокинетикой (например, L15H11, L46H11 и L47H65 согласно фиг. 5В) имели улучшенную концентрацию в мозге.

Интрацеребральную миграцию каждого из гуманизированных антител L15H11, L46H11 и L47H65 анализировали с использованием химерного антитела Ta1505 и известных гуманизированных антител соланезумаба, IPN007 и MAб3221, которые использовались в клинических испытаниях для лечения БА, в качестве эталонных антител.

Через одну неделю после введения каждого антитела из примера 6 у мышей брали кровь, затем их подвергали лапаротомии под наркозом тремя типами смешанных анестетиков. После смерти от обескровливания из брюшной полых вены собирали ткани головного мозга. Собранные ткани мозга разделяли на правое и левое полушария, которые замораживали в этаноле в сухом льду и хранили при -80°C . Каждое из замороженных полушарий взвешивали и переносили в пробирку объемом 2 мл, в которую добавляли 0,8 мл TBS-I (трис-буферный солевой раствор, коктейль с ингибитором протеазы и коктейль с ингибитором фосфатазы). Каждое полушарие затем обрабатывали ультразвуком в ледяной воде. Обработанный ультразвуком раствор центрифугировали при $3000\times g$ при 4°C в течение 10 минут, и супернатант собирали и дополнительно ультрацентрифугировали при $100000\times g$ при 4°C в течение 15 минут для получения гомогената мозга.

Уровень антител в гомогенате мозга измеряли с помощью антигенного твердофазного ИФА с использованием поликлонального анти-человеческого антитела. В частности, раствор PBS, содержащий 10 мкг/мл козьего анти-человеческого антитела Fc IgG добавляли в 96-луночный планшет (Max Sorp (NUNC)) для иммобилизации при 4°C в течение ночи с последующим блокированием 3% БСА-PBS для получения иммобилизованного планшета.

Отдельно ряд стандартных образцов антител известных концентраций готовили путем серийного разведения каждого антитела гомогенатом мозга, полученного от мыши, которой антитело не вводили, и измеряли для получения калибровочной кривой.

Гомогенаты мозга и стандартные образцы, подлежащие измерению, каждый раз разбавляли в 10 раз 3%-ным БСА-PBS с 0,1% обезжиренного молока и добавляли в иммобилизованный планшет PD17 (P) при 50 мкл/лунку для реакции при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем планшет промывали TBS-T (TBS, 0,05% Tween 20). Впоследствии раствор анти-человеческого поликлонального антитела, меченного щелочной фосфатазой IgG (H+L) (Sigma-Aldrich Co. LLC, кат. № SAB3701337: 1 мг), разбавленного в 2000 раз 0,1% обезжиренным молоком и 3% БСА-PBS добавляли в планшет при 50 мкл/лунку, для обеспечения прохождения реакции при комнатной температуре в течение одного часа. После промывания планшета TBS-T, pNPP (Sigma-Aldrich Co. LLC, кат. № P7998: 100 мкл) добавляли в качестве хромогенного субстрата при 100 мкл/лунку с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение одного часа. Затем измеряли поглощение с помощью планшет-ридера при длине волны измерения, равной 405 нм, и эталонной длине волны, равной 550 нм. Калибровочную кривую готовили на основе результатов измерения стандартных образцов, и уровень антител в каждом образце гомогената мозга определяли с использованием калибровочной кривой и оценивали как уровень антител в мозге.

Кроме того, уровень антител в плазме определяли, используя кровь, собранную перед лапаротомией, таким же образом, как в примере 6, и рассчитывали отношение уровня антител в мозге к уровню в плазме.

Фиг. 6В представляет собой график, показывающий отношение уровня каждого антитела в мозге к уровню соответствующего антитела в плазме. Соотношения концентраций антител в мозге к концентрациям антител в плазме гуманизированных антител L15H11, L46H11 и L47H65 были высокими по сравнению с соотношениями химерного антитела Ta1505 и известных гуманизированных антител IPN007, MAб3221 и соланезумаба. Результаты показывают, что эти гуманизированные антитела характеризуются высокой миграцией в мозг.

Пример 8: Дополнительная разработка селективных гуманизированных антител.

Последующие мутации были введены в последовательность CDR1 VL46 для удаления горячей точки дезамидирования и/или для возврата последовательности CDR к родительской последовательности мыши. Табл. 11 обобщает мутации, введенные в CDR1 VL46.

Таблица 11
Мутации, введенные в CDR1 VL46

Мутация	Цель
VL46_G34A (SEQ ID NO:105)	Удаление дезамидирования
VL46_G34S (SEQ ID NO:106)	Удаление дезамидирования
VL46_G34T (SEQ ID NO:107)	Удаление дезамидирования
VL46_N33Q (SEQ ID NO:108)	Удаление дезамидирования
VL46_N33Q_G34A (SEQ ID NO:109)	Удаление дезамидирования
VL46_N33D (SEQ ID NO:110)	Имитирование полного дезамидирования
VL46_N33S (SEQ ID NO:111)	Удаление дезамидирования
VL46_N33T (SEQ ID NO:112)	Удаление дезамидирования
VL46_S28N (SEQ ID NO:113)	Возвращение CDR1 LC мыши
VL46_G34A_S28N (SEQ ID NO:114)	Удаление дезамидирования и возвращение CDR1 LC мыши

Кроме того, различные изотипы IgG, включая IgG1 и IgG4 с мутацией S228P, были протестированы в новых созданных вариантах гуманизированных антител. В табл. 12 представлены легкая цепь и тяжелая цепь новых созданных вариантов гуманизированных антител вместе с родительским антителом мыши и химерным антителом.

Таблица 12
Легкая цепь и тяжелая цепь специфических антител

Мышиное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505) IgG2a/каппа (HY)	ms IgG2a
Химерное человеческое/мышиное [МАРТ_Н] mAb (Ta1505) IgG1/каппа (CX)	chim. IgG1
Химерное человеческое/мышиное [МАРТ_Н] mAb (Ta1505) IgG4 S228P/каппа (CX)	chim. IgG4
Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505 VL46/VH11) IgG1/каппа (CX)	hu VL46/VH11 IgG1
Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505 VL46/VH11) IgG4 S228P/каппа (CX)	hu VL46/VH11 IgG4
Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46 G34A/VH11) IgG1/каппа (CX)	hu VL46/VH11 G34A IgG1

Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46_G34A/VH11) lgG4 S228P/каппа (CX)	hu VL46/VH11 G34A lgG4
Гуманизированное x МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46_G34S/VH11) lgG4 S228P/каппа (CX)	hu VL46/VH11 G34S lgG4
Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46_G34T/VH11) lgG4S228P/ каппа (CX)	hu VL46/VH11 G34T lgG4
Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46_N33Q/VH11) lgG4S228P/каппа (CX)	hu VL46/VH11 N33Q lgG4
Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46_N33Q G34A/VH11) lgG4 S228P/ каппа (CX)	hu VL46/VH11 N33Q G34A lgG4
Гуманизированное x МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46_N33D/VH11) lgG4 S228P/каппа (CX)	hu VL46/VH11 N33D lgG4
Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46_N33S/VH11) lgG4 S228P/каппа (CX)	hu VL46/VH11 N33S lgG4
Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46_N33T/VH11) lgG4 S228P/каппа (CX)	hu VL46/VH11 N33T lgG4
Гуманизированное x МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46/ VH11A64D) lgG4 S228P/каппа (CX)	hu VL46/VH11 A64D lgG4
Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46S28N/VH11) lgG4 S228P/ каппа (CX)	hu VL46/VH11 S28N lgG4
Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL47/VH65) IgG1/ каппа (CX)	hu VL47/ VH65 IgG1
Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46 G34A S28N/VH11) IgG1/каппа (CX)	hu VL46/VH11 G34A S28N IgG1
Гуманизированное x МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VL46 G34A S28N/VH11) lgG4 S228P/каппа (CX)	hu VL46/VH11G34A S28N lgG4

Пример 9: Анализ связывания Biacore™ новых созданных вариантов гуманизированных антител.

Аффинность связывания новых созданных вариантов гуманизированных антител измеряли с использованием биосенсоров Biacore™ T200 и 4000 (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс). Следующий подвижный буфер: 10 mM HEPES (GE Healthcare, BR100671), 150 mM NaCl (GE Healthcare, BR100671), 0,05% об./об. ПАВ P20 (GE Healthcare, BR100671), 2 mM DTT (Sigma, 10708984001, Сент Луис, штат Миссури) и 1 mM ЭДТА (GE Healthcare, 28995043), был использован для иммобилизации, разбавления образца и сбора данных, если не указано иное.

Иммобилизованный белок относится к рекомбинантному фосфорилированному белку Тау человека, иммобилизованному на чипе; термин "иммобилизованный пептид 1xP" относится к фосфорилированному пептиду (TSPRHLSNVS (pS) TGSIDMVDSPC, SEQ ID NO: 75), иммобилизованному на чипе. Оба этих метода имеют avidный компонент для измерения аффинности. 4xP пептидный анализ имеет антитело, захваченное на чипе, и 4x фосфорилированный пептид (GAEIVYK(pS) PWSGDT (pS) PRHLSNVS (pS) TGSIDMVD(pS) PQLATLADEVASASLAKQ GL, SEQ ID NO: 78) в растворе.

Связывание антител с иммобилизованным фосфорилированным тау-белком измеряли с использованием сенсорных чипов серии S NTA (GE Healthcare, BR100034). Подвижный буфер для иммобилизации представлял собой 10 mM HEPES, 150 mM NaCl₂, 0,05% об./об. ПАВ P20, pH 7,4 (GE Healthcare, BR100671), а скорость потока составляла 10 мкл/мин. 350 mM ЭДТА впрыскивали в течение 1 минуты для очистки чипа, а затем в течение 2 минут вводили 0,5 mM NiCl₂ (GE Healthcare, набор реагентов NTA) для подготовки чипа к захвату his-меченого белка. Чип активировали в соответствии с инструкциями производителя с использованием набора для иммобилизации по аминокислоте (GE Healthcare, BR100633), затем 300 nM фосфорилированного тау-белка (80AWB) вводили до тех пор, пока желаемое количество белка не было иммобилизовано. Чип был заблокирован этаноламином из набора для иммобилизации по аминокислоте. В каждом эксперименте использовали несколько уровней иммобилизованного фосфорилированного тау-белка. Самый низкий уровень варьировал от 54 резонансных единиц (RU) до 452 RU, а самый высокий уровень варьировал от 463 RU до 1020 RU. Чтобы измерить аффинность связывания антитела Ta1505 с иммобилизованным фосфорилированным тау-белком, был приготовлен 5-членный 3-кратный ряд разведений каждого антитела, что привело к концентрациям от 0,37 nM до 30 nM. Каждую

концентрацию и несколько чистых буферных растворов вводили в течение 3 минут при скорости потока, равной 45 мкл/мин. Диссоциацию антитела отслеживали в течение 15 минут, затем поверхность восстанавливали путем инъекции от 30 секунд до 1 минуты 100 мМ CAPS (Sigma, C6070), 1 М KCl (Sigma, P9541), 1 мМ ЭДТА, 2 мМ DTT pH 10,5.

Связывание антител с иммобилизованным фосфорилированным тау-пептидом измеряли с использованием сенсорного чипа серии S CM3 (GE Healthcare, BR100536). Чип активировали с использованием набора для иммобилизации по аминокислоте, затем 30 мкг/мл фосфорилированного тау-пептида (SEQ ID NO: 75) в 10 мМ ацетате натрия, pH 5,0 вводили до иммобилизации 51 RU. Чип был заблокирован этаноламином. Эталонную поверхность отрицательного контроля готовили аналогичным образом, используя

нефосфорилированный тау-пептид (TSPRHLSNVSTGSIDMVDSPC, SEQ ID NO: 77). Чтобы измерить аффинность связывания антитела Ta1505 с иммобилизованным фосфорилированным тау-пептидом, был приготовлен 5-членный 3-кратный ряд разведений каждого антитела, что привело к концентрациям от 0,37 до 30 нМ. Каждую концентрацию и несколько чистых буферных растворов вводили в течение 3 минут при скорости потока, равной 45 мкл/мин. Диссоциацию антитела отслеживали в течение 15 минут. Поверхность восстанавливали посредством 30-секундной инъекции 100 мМ соляной кислоты (Fisher Scientific, SA56-1, Волтэм, штат Массачусетс).

Связывание фосфорилированного тау-пептида с иммобилизованным антителом измеряли с использованием сенсорных чипов серии S CM5 (GE Healthcare, 29149603). Чип активировали с использованием набора для иммобилизации по аминокислоте, затем вводили от 1 до 3 мкг/мл антитела в 10 мМ ацетате натрия, pH 5,0 (Ge Healthcare, BR100351) до тех пор, пока не было иммобилизовано от 280 до 9100 RU антител. Чип был заблокирован этаноламином. Чтобы измерить аффинность связывания фосфорилированного тау-пептида (SEQ ID NO: 78) с иммобилизованными антителами Ta1505, был приготовлен 6-членный 2,5-кратный ряд разведений пептида, что привело к концентрациям от 5,1 до 500 нМ. Образцы и несколько чистых буферных растворов вводили со скоростью 30-50 мкл/мин в течение 3 минут, и диссоциацию отслеживали в течение 15 минут. Поверхность восстанавливали посредством 30-секундной инъекции 20 мМ ацетата натрия, pH 4,5, либо без корректировки, либо с доведением pH до 3,5 соляной кислотой.

Данные обрабатывали и корректировали с использованием оценочного программного обеспечения Biacore™ T200 версии 2.0 или оценочного программного обеспечения Biacore™ 4000 версии 1.1 (GE Healthcare). Данные "дважды корректировали" путем вычитания ответа от отрицательной контрольной проточной ячейки и вычитания ответа от инъекции буфера, или среднего ответа от двух инъекций буфера. Затем данные были согласованы с моделью "1:1 связывания" для определения константы скорости ассоциации, k_a ($M^{-1}s^{-1}$, где "M" равно молярности и "с" равно секундам) и константы скорости диссоциации, k_d (s^{-1}). Эти константы скорости были использованы для расчета равновесной константы диссоциации, K_D (M) = k_d/k_a . В табл. 13 приведены значения K_D новых созданных вариантов гуманизированных антител по сравнению со значениями родительского антитела мыши и химерного антитела.

Таблица 13

Значения K_D (нМ) антител к фосфорилированному тау-белку или пептиду

	Иммобилизо- ванный белок	Иммобилизо- ванный 1xP пептид	Пептид- аналит 4xP
мс IgG2a	0,43	0,03	17,5
хим. IgG1	0,46	0,04	27,2
хим. IgG4	0,58	0,06	28,5
hu VL46 (SEQ ID NO:163)/ VH11 IgG1 (SEQ ID NO:144)	0,46	0,06	24,3
hu VL46 (SEQ ID NO:163)/ VH11 IgG4 (SEQ ID NO:152)	0,70	0,09	39,3
hu VL46 G34A (SEQ ID NO:166)/ VH11 IgG1 (SEQ ID NO:144)	0,28	н/д	н/д
hu VL46 G34A (SEQ ID NO:166) / VH11 IgG4 (SEQ ID NO:151)	0,52	0,09	36,2

hu VL46 G34S (SEQ ID NO:168) / VH11 IgG4 (SEQ ID NO:151)	н/с	н/с	н/д
hu VL46 G34T (SEQ ID NO:170) / VH11 IgG4 (SEQ ID NO:151)	0,75	0,13	н/д
hu VL46 N33Q (SEQ ID NO:172) / VH11 IgG4 (SEQ ID NO:151)	1,27	0,14	н/д
hu VL46 N33Q G34A (SEQ ID NO:174) / VH11 IgG4 (SEQ ID NO:151)	3,40	0,31	н/д
hu VL46 (SEQ ID NO:163) / VH11 IgG4 (SEQ ID NO:151)	н/с	1,78	н/д
hu VL46 N33S (SEQ ID NO:178) / VH11 IgG4 (SEQ ID NO:151)	2,31	0,29	н/д
hu VL46 N33T (SEQ ID NO:180) / VH11 IgG4 (SEQ ID NO:151)	1,31	0,18	н/д
hu VL46 A64D/VH11 IgG4 (SEQ ID NO:151)	0,77	0,16	н/д
hu VL46 S28N (SEQ ID NO:183) / VH11 IgG4 (SEQ ID NO:151)	0,42	0,10	32,5
hu VL47 (SEQ ID NO:164) / VH65 IgG1 (SEQ ID NO:153)	0,45	0,06	н/д
hu VL46 G34A S28N (SEQ ID NO:184) / VH11 IgG1 (SEQ ID NO:144)	0,43	н/д	н/д
hu VL46 G34A S28N (SEQ ID NO:184) / VH11 IgG4 (SEQ ID NO:151)	0,80	н/д	н/д

Пример 10: Твердофазный ИФА связывания родительского антитела мыши, химерного антитела и некоторых вариантов гуманизированных антител.

Связывание родительского мышинового антитела, химерного антитела и новых созданных вариантов гуманизированного антитела с фосфорилированным пептидом (PRHLSNVS (pS) TGSIDMVD, SEQ ID NO: 79) и соответствующим нефосфорилированным пептидом (PRHLSNVSTGSIDMVD, SEQ ID NO: 80) анализировали методом твердофазного ИФА.

Пятьдесят микролитров 1 мкг/мл фосфорилированного или нефосфорилированного пептида в PBS добавляли в каждую лунку планшетов для твердофазного ИФА и планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующие сутки планшеты промывали 3 раза и блокировали 200 мкл суперблока при 4°C в течение ночи. На третьи сутки планшеты промывали 3 раза. Затем 50 мкл антител в серийном разведении 1:3 в буфере для твердофазного ИФА, начиная с 10 мкг/мл, добавляли в каждую лунку планшета, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем промывали 3 раза. Пятьдесят микролитров разведенного 1:3000 козьего анти-мышинового-HRP (Southern Biotech, 1030-05) были добавлены для измерения родительского антитела мыши. Пятьдесят микролитров разведенного 1:3000 козьего анти-мышинового-HRP (Jackson Immunologics, 109-036-098) добавляли для измерения химерного антитела и гуманизированного антитела. Планшеты для твердофазного ИФА инкубировали при комнатной температуре в течение 45 минут, промывали 3 раза, затем проявляли с помощью ABTS при комнатной температуре в течение 5 минут. После этого использовали ридер планшетов для измерения поглощения при 405 нм.

Фиг. 8A и 8B демонстрируют, что родительское антитело, генерируемое гибридным или рекомбинантным способом, связывается с фосфорилированным пептидом (фиг. 8A), но не с нефосфорилированным пептидом (фиг. 8B). Аналогично, химерные антитела (с каркасом IgG1 или IgG4) связываются с фосфорилированным пептидом (фиг. 8C), но не с нефосфорилированным пептидом (фиг. 8D).

На фиг. 9A-9C показано, что большинство новых созданных вариантов гуманизированных антител связываются с фосфорилированным пептидом с аффинностью, сравнимой с химерным антителом IgG4, тогда как несколько вариантов теряют аффинность связывания с фосфорилированным пептидом. В частности, на фиг. 9B, вариант huVL46/VH11_N33D_IgG4, который имитирует полное дезамидирование аминокислоты N33-D, имеет значительно сниженное связывание с фосфорилированным пептидом, что позволяет предположить, что полностью дезамидированное антитело значительно теряет свою аффин-

ность связывания с фосфорилированным тау-белком. Таким образом, снижение дезамидирования в N33 в вариантах гуманизированных антител является обязательным.

Пример 11: Антигенсвязывающий анализ новых созданных вариантов гуманизированных антител в гомогенатах мозга пациентов с болезнью Альцгеймера.

Родительское антитело мыши, химерное антитело и выбранные варианты гуманизированных антител оценивали в отношении их способности к связыванию с фосфорилированным тау-белком Ser413 (pSer413-Tau), полученным из клинических образцов в жидкой фазе пациентов с болезнью Альцгеймера (БА).

Как показано на фиг. 10А-10Е, присутствие антител на pSer413-Tau определяли по разнице между общим и свободным связыванием антигена, выявляемым с использованием мышиного биотинилированного антитела IgG2a-Ta1505 после инкубации образцов мозга с БА с увеличением концентрации контрольного IgG человека (Sigma, кат № I2511) и выбранных вариантов антител соответственно.

Выявление с помощью того же самого мышиного биотинилированного антитела IgG2a Ta1505 позволяет проводить прямое сравнение эффективности связывания между вариантами антител. Антитело IgG2a мыши Ta1505 биотинилировали с использованием N-гидроксисукцинимид-LC-биотина (NHS-LC-биотин) (Thermo Fisher Scientific K.K.) с последующим диализом с помощью PBS.

Замороженную префронтальную ткань коры головного мозга (100 мг) из мозга пациента с БА добавляли к 1 мл TBS-I (трис-буферный солевой раствор, кат. № BP2471-1, Thermo Fisher Scientific), содержащего коктейль с ингибитором протеазы и фосфатазы (Thermo Fisher Scientific, кат. № 1861281), и лизировали в ледяной воде с использованием Qiagen Tissue Lyzer II. Гомогенизированный образец центрифугировали при 27000 g (ротатор TLA-55) при 4°C в течение 20 минут в ультрацентрифуге Beckman Coulter Optima Max-XP, и супернатант собирали и дополнительно центрифугировали при 150000×g (ротатор TLA-55) при 4°C в течение 20 минут в ультрацентрифуге Beckman Coulter Optima Max-XP для получения гранулы, называемой фракцией P2. Фракцию P2 повторно суспендировали в буфере для гомогенизации TBS-I с помощью ультразвука. Концентрацию белка во фракции P2 определяли с использованием набора для анализа белка Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific, кат. № 23225) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию белка доводили до 4 мкг/мл.

Набор INNOTEST® pTau (pT181) (Fijirebio Inc., кат. № 81581) использовали в качестве системы твердофазного ИФА для фосфорилированного белка Tau Ser413 (pSer413-Tau), но биотинилированное антитело, включенное в набор (обозначенное как CONJ1), было заменено на биотинилированные мышьи антитела к IgG2a Ta1505, как описано выше.

Родительское антитело мыши, химерное антитело, варианты гуманизированного антитела или контрольный IgG человека разводили до 200 нМ из исходного раствора в буфере для разбавителя образца (предоставлен набором INNOTEST®). Растворы антител затем серийно разбавляли и инкубировали с фракциями P2 головного мозга с БА, предварительно разведенными в 1/1000 в аналитическом планшете, в течение 4 часов при комнатной температуре. Смесь антитело-антиген затем добавляли в планшет МТ с иммобилизованным антителом HT7 (включенный в набор) вместе с разведенным биотинилированным антителом мыши Ta1505 IgG2a (1/10 в CONJ DIL 1, предоставленном набором INNOTEST®). Полученный образец перемешивали и инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день планшет промывали и в планшет добавляли меченный HRP стрептавидин (включенный в набор как CONJ2) с последующей инкубацией в течение одного часа. После промывки добавляли красящий реагент ТМВ с последующей инкубацией с защитой от света при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем реакцию останавливали с помощью раствора ограничителя реакции (включенного в набор в качестве раствора STOP) и измеряли оптическую плотность при длине волны, равной 450 нм.

Нелинейный анализ кривой концентрация-ответ, показанный на фиг. 10А-10Е, позволяет определить концентрацию каждого антитела, необходимую для 50%-ной занятости Tau pSer413 в гомогенатах мозга с БА, а также процент максимального уровня занятости для каждого антитела. На фиг. 10А-10Е продемонстрированы сопоставимые характеристики связывания, включая уровень занятости *in vitro* и максимальное связывание тау-антигена pSer413, для родительского антитела мыши, химерного антитела и выбранных вариантов гуманизированных антител в гомогенатах мозга пациентов с БА.

Пример 12: Анализ стабильности и чистоты новых созданных вариантов гуманизированных антител.

Стабильность различных антител определяли путем измерения температуры плавления (T_{m1}) и температуры агрегации (Tagg) с помощью нано-DSF. Чистоту каждого антитела измеряли с помощью SEC и невосстанавливающего капиллярного SDS (NR-cSDS).

Определение T_m и Tagg: T_m и Tagg определяли с помощью нано-DSF с использованием дифференциального сканирующего флуориметра Prometheus NT.48 (Nanotemper Technologies), управляемого программным обеспечением PR.ThermControl v2.0.4. Мощность возбуждения составляла 40%, а температура повышалась с 20°C до 95°C со скоростью 1°C/мин. T_m и Tagg были автоматически измерены. Образцы готовили посредством разбавления до 1 мг/мл в 20 мМ ацетате натрия, pH 5,5, буфере и всасывали капиллярным способом в стеклянный капилляр Prometheus (PR-L002).

Определение чистоты посредством SEC: SEC проводили на системе ACQUITY UPLC H-класса. Используемая колонка представляла собой колонку ACQUITY UPLC Protein BEH SEC (№ партии 186005225, 1,7 мкм, 200А, 4,6 мм×150 мм) от Waters (Милфорд, штат Массачусетс). Температура колонки составляла 25°C, и образец 10 мкл вводили при 1 мг/мл, используя системную скорость потока, равную 0,5 мл/мин. Подвижная фаза представляла собой 100 мМ фосфата натрия, 200 мМ хлорида натрия и 0,02% азид натрия, pH 7,0. Данные были определены количественно при 214 и 280 нм и проанализированы с использованием программного обеспечения Empower 3. Белковую стандартную смесь BEH200 SEC (№ партии 186006518) от Waters (Милфорд, штат Массачусетс) вводили в дозе 10 мкг и измеряли разрешение USP, теоретические значения и хвосты.

Определение чистоты посредством NR-cSDS: для оценки чистоты посредством NR-cSDS 5 мкл каждого образца в концентрации 1 мг/мл смешивали в 96-луночной планшете с 35 мкл буфера для загрузки (буфер для образцов HT Protein Express (Perkin Elmer)), содержащего 50 мМ йодацетамида. Планшет инкубировали при 70°C в течение 20 минут и в каждую лунку добавляли 75 мкл воды. Каждый образец анализировали в системе LabChip GXII (Perkin Elmer) с использованием экспрессионного чипа HT Protein (Perkin Elmer). Электроферограммы получали путем измерения флуоресценции образца в динамике по времени и интегрировали с использованием программного обеспечения LabChip GX V4.1.1619.0 SP1 (Perkin Elmer).

В табл. 14 представлена стабильность и чистота исследуемых антител.

Таблица 14

Стабильность и чистота различных антител

	Стабильность		Чистота	
	Tm1	Tagg	% чистоты по SEC	% чистоты по NR-cSDS
мс IgG2a	65,0	н/д	99,1	100
хим. IgG1	н/д	н/д	96,2	н/д
хим. IgG4	н/д	н/д	95,3	н/д
hu VL46/VH11 IgG1	68,5	69,5	99,0	100
hu VL46/VH11 IgG4 (эп.)	66,8	66,0	98,4	100
hu VL46/VH11 G34A IgG1	65,9	66,2	100	100
hu VL46/VH11 G34A IgG4	64,0	63,8	100	98,0
hu VL46/VH11 G34A IgG4	65,3	66,6	100	100
hu VL46/VH11 G34S IgG4	н/д	н/д	н/д	100,0
hu VL46/VH11	65,8	66,5	н/д	99,3

G34T IgG4				
hu VL46/VH11 N33Q IgG4	65,2	67,1	99,6	100
hu VL46/VH11 N33Q G34A IgG4	н/д	н/д	н/д	100
hu VL46/VH11 N33D IgG4	н/д	н/д	н/д	100
hu VL46/VH11 N33S IgG4	н/д	н/д	н/д	99,8
hu VL46/VH11 N33T IgG4	н/д	н/д	н/д	100
hu VL46/VH11 A64D IgG4	н/д	н/д	н/д	100
hu VL46/VH11 S28N IgG4	68,1	67,8	99,6	100
hu VL47/VH65 IgG1	59,6	60,2	99,9	100
hu VL46/VH11 G34A S28N IgG1	65,5	66,7	100	97,0
hu VL46/VH11 G34A S28N IgG4	63,8	65,0	100	97,0

Все новые созданные варианты гуманизованных антител сохраняли или улучшали стабильность и чистоту по сравнению с родительским антителом мыши или химерными антителами. Один из исходных гуманизованных вариантов huVL47/VH65 IgG1 отличался сниженной стабильностью, измеренной с помощью Tm1/Tagg.

Пример 13: Анализ дезамидирования новых созданных вариантов гуманизованных антител.

Определяли уровень дезамидирования аминокислоты N33 в CDR1 легкой цепи различных антител. Исследовали стрессовые условия, такие как инкубация при 50°C или pH 10. Инкубацию при 4°C проводили в качестве контроля.

Инкубация при 4 и 50°C: Образцы, приготовленные в 20 mM ацетате натрия, pH 5,5, при 2 мг/мл, выдерживали при 50°C в камере с контролируемой температурой стабильности в течение одной недели. Образцы хранили при 4°C для контроля 4°C в целях сравнения.

Инкубация при pH 10: Образцы, приготовленные в 20 mM ацетате натрия, pH 5,5, при 2 мг/мл, доводили до pH 10 с использованием 0,5 M NaOH и выдерживали при 25°C в течение одной недели в климатической камере с контролируемой температурой. После этого проводили замену буфера образцов на 20 mM ацетат натрия, pH 5,5, с использованием обессоливающих колонок Zeba Spin (7K MWCO, Thermo Fisher 2 мл, 89890).

Анализ дезамидирования с помощью пептидного картирования: Для картирования пептидов с помощью масс-спектрометрии 100 мкг каждого образца денатурировали с помощью 30 мкл 8 M раствора гуанидина/1 M трис гидрохлорида (15:1), восстанавливали с помощью 2 мкл 1 M DTT в течение 30 минут при 60°C и алкилировали с 5 мкл 1 M йодацетамида в течение 45 минут в темноте. Перед расщеплением проводили замену буфера образцов на 50 mM бикарбонат аммония, используя картриджи ZEBА с молекулярной массой 7 килодальтон. Образцы распределяли по разным пробиркам и обрабатывали ферментом параллельно с 2 мкг трипсина и химотрипсина в течение 2 часов при 37°C. Ферментация была остановлена посредством добавления 3 мкл 5 M гидрохлорида к каждому образцу. 2 мкл образца впрыскивали в 1x50 мм колонку Waters UPLC с пептидом BEH-C18 (часть № 186005592), поддерживаемую при 40°C. Данные были получены в Dionex/QE plus MS с использованием линейного градиента в течение 50 мин от 2% до 36% ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте. Образцы были проанализированы с использованием PEAKS DB (Bioinformatics Solutions Inc.) для поиска в базе данных, а также PepFinder (Thermo Fisher Scientific) и ручной проверки для оценки процентного изменения. В табл. 15 приведен процент дезамидирования аминокислоты N33 в CDR1 легкой цепи исследуемых антител.

Таблица 15

Процент дезамидирования N33 в CDR1 легкой цепи при различных условиях

	Контроль 4 °С	50°С	pH 10
mc IgG2a	41,1	36,9	31,7
hu VL46/VH11 IgG1	33,0	33,9	31,8
hu VL46/VH11 IgG4	32,0	31,0	37,9
hu VL46/VH11 G34A IgG4	<1%	н/д	<1%
hu VL46/VH11 G34T IgG4	<1%	н/д	<1%
hu VL46/VH11 N33Q IgG4	<1%	н/д	<1%
hu VL46/VH11 G34A S28N IgG1	<1%	1,2	1%
hu VL46/VH11 G34A S28N IgG4	<1%	2,1	1%

По сравнению с родительским антителом мыши и исходным гуманизированным вариантным антителом IgG1 или IgG4 (VL4 6/VH11) новые созданные варианты гуманизованного антитела демонстрируют значительное снижение уровня дезамидирования N33 в CDR1 легкой цепи.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против pSer413 тау или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

(А) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

vhCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86;

vhCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115; и

vhCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; и

(В) вариабельный домен легкой цепи, содержащий набор vlCDR, выбранных из группы, состоящей

из:

(i) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(ii) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(iii) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(iv) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(v) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(vi) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(vii) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(viii) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(ix) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(x) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(xi) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83; и

(xii) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

2. Антитело против pSer413 тау или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где отношение аффинности связывания указанного антитела с фосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 8 к аффинности связывания указанного антитела с нефосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 69 составляет по меньшей мере около 40 к 1.

3. Применение антитела против pSer413 тау или его антигенсвязывающего фрагмента по п.1 для получения лекарственного средства для лечения таупатии у пациента.

4. Применение по п.3, где таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, кортикобазальной дегенерации, прогрессирующего надъядерного паралича, болезни Пика, аргирофильной зернистой деменции (болезни аргирофильного зерна), множественной системной таупатии с деменцией (MSTD), лобно-височной деменции с паркинсонизмом, сцепленной с хромосомой 17 (FTDP-17), деменции с нейрофибриллярными клубками, диффузными нейрофибриллярными клубками с кальцификацией (DNTC), таупатии белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI), лобно-височной лобарной дегенерации с тау-позитивными включениями (FTLD-тау), последствий энцефалита Экономо и подострого склерозирующего панэнцефалита и энцефалопатии боксеров.

5. Антитело против pSer413 тау или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

(A) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий vhCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; vhCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115; vhCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; и

(B) вариабельный домен легкой цепи, содержащий vlCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; vlCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и vlCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

6. Антитело против pSer413 тау или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где отношение аффинности связывания указанного антитела с фосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 8 к аффинности связывания указанного антитела с нефосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 69 составляет по меньшей мере около 40 к 1.

7. Применение антитела против pSer413 тау или его антигенсвязывающего фрагмента по п.5 для получения лекарственного средства для лечения таупатии у пациента.

8. Применение по п.7, где таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, кортикобазальной дегенерации, прогрессирующего надъядерного паралича, болезни Пика, аргирофильной зернистой деменции (болезни аргирофильного зерна), множественной системной таупатии с деменцией (MSTD), лобно-височной деменции с паркинсонизмом, сцепленной с хромосомой 17 (FTDP-17), деменции с нейрофибриллярными клубками, диффузными нейрофибриллярными клубками с кальцификацией (DNTC), таупатии белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI), лобно-височной лобарной дегенерации с тау-позитивными включениями (FTLD-тау), последствий энцефалита Экономо и подострого склерозирующего панэнцефалита и энцефалопатии боксеров.

9. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое вызывает реакцию антиген-антитело с тау-белком или тау-пептидом, фосфорилированным по меньшей мере на аминокислотном остатке, соответствующем Ser413 SEQ ID NO: 1, содержащее:

(A) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

vhCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86;

vhCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115; и

vhCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; и

(B) вариабельный домен легкой цепи, содержащий набор vlCDR, выбранных из группы, состоящей

из:

(i) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(ii) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(iii) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(iv) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(v) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

(vi) vlCDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96;

vlCDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и

vlCDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;

- (vii) v1CDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; v1CDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и v1CDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;
- (viii) v1CDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98; v1CDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и v1CDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;
- (xi) v1CDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; v1CDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и v1CDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;
- (x) v1CDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; v1CDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и v1CDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83;
- (xi) v1CDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; v1CDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и v1CDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83; и
- (xii) v1CDR1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; v1CDR2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и v1CDR3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

10. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, где отношение аффинности связывания указанного антитела с фосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 8 к аффинности связывания указанного антитела с нефосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 69 составляет по меньшей мере около 40 к 1.

11. Применение гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.9 для получения лекарственного средства для лечения таупатии у пациента.

12. Применение по п.11, где таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, кортикобазальной дегенерации, прогрессирующего надъядерного паралича, болезни Пика, аргирофильной зернистой деменции (болезни аргирофильного зерна), множественной системной таупатии с деменцией (MSTD), лобно-височной деменции с паркинсонизмом, сцепленной с хромосомой 17 (FTDP-17), деменции с нейрофибрилярными клубками, диффузными нейрофибрилярными клубками с кальцификацией (DNTC), таупатии белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI), лобно-височной лобарной дегенерации с тау-позитивными включениями (FTLD-тау), последствий энцефалита Экономо и подострого склерозирующего панэнцефалита и энцефалопатии боксеров.

13. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое вызывает реакцию антиген-антитело с тау-белком или тау-пептидом, фосфорилированным по меньшей мере на аминокислотном остатке, соответствующем Ser413 SEQ ID NO: 1, содержащее:

(A) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий vHCDR1, содержащий аминокислотную последовательность 1M (SEQ ID NO: 10);

vHCDR2, содержащий аминокислотную последовательность 2H1 (SEQ ID NO: 12), или аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности 2H1 (SEQ ID NO: 12) тем, что Ala в положении 15 замещен Asp;

vHCDR3, содержащий аминокислотную последовательность 3M (SEQ ID NO: 13); и

(B) вариабельный домен легкой цепи, содержащий

vLCDR1, содержащий аминокислотную последовательность 4L1 (SEQ ID NO: 14), или аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности 4L1 (SEQ ID NO: 14) тем, что Ser в положении 5 замещен Asn;

vLCDR2, содержащий аминокислотную последовательность 5M (SEQ ID NO: 16); и

vLCDR3, содержащий аминокислотную последовательность 6M (SEQ ID NO: 17).

14. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, содержащее:

(A) vHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность 1M (SEQ ID NO: 10);

vHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность 2H1 (SEQ ID NO: 12);

vHCDR3, содержащий аминокислотную последовательность 3M (SEQ ID NO: 13);

vLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность 4L1 (SEQ ID NO: 14);

vLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность 5M (SEQ ID NO: 16); и

vLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность 6M (SEQ ID NO: 17), или

(B) vHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность 1M (SEQ ID NO: 10);

vHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность 2H1 (SEQ ID NO: 12);

vHCDR3, содержащий аминокислотную последовательность 3M (SEQ ID NO: 13);

vLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность 4M (SEQ ID NO: 15);

vLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность 5M (SEQ ID NO: 16); и

vLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность 6M (SEQ ID NO: 17), или

(C) vHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность 1M (SEQ ID NO: 10);

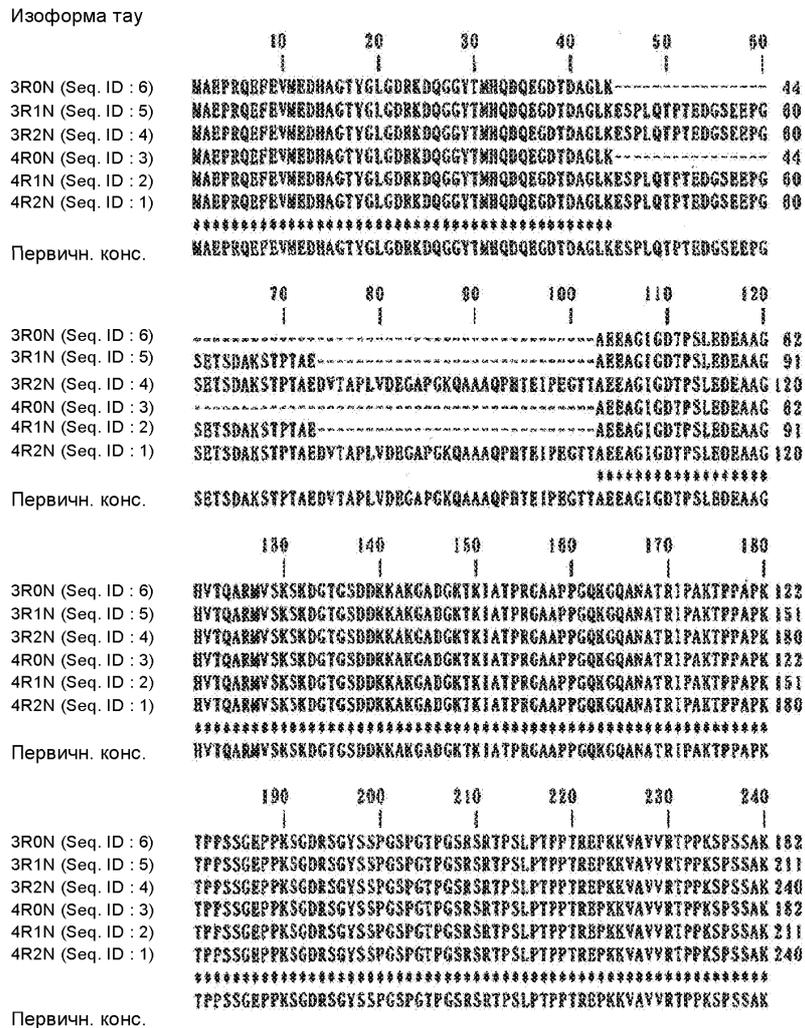
vHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность 2M (SEQ ID NO: 11);

vhCDR3, содержащий аминокислотную последовательность 3М (SEQ ID NO: 13);
 vlCDR1, содержащую аминокислотную последовательность 4М (SEQ ID NO: 15);
 vlCDR2, содержащую аминокислотную последовательность 5М (SEQ ID NO: 16); и
 vlCDR3, содержащую аминокислотную последовательность 6М (SEQ ID NO: 17).

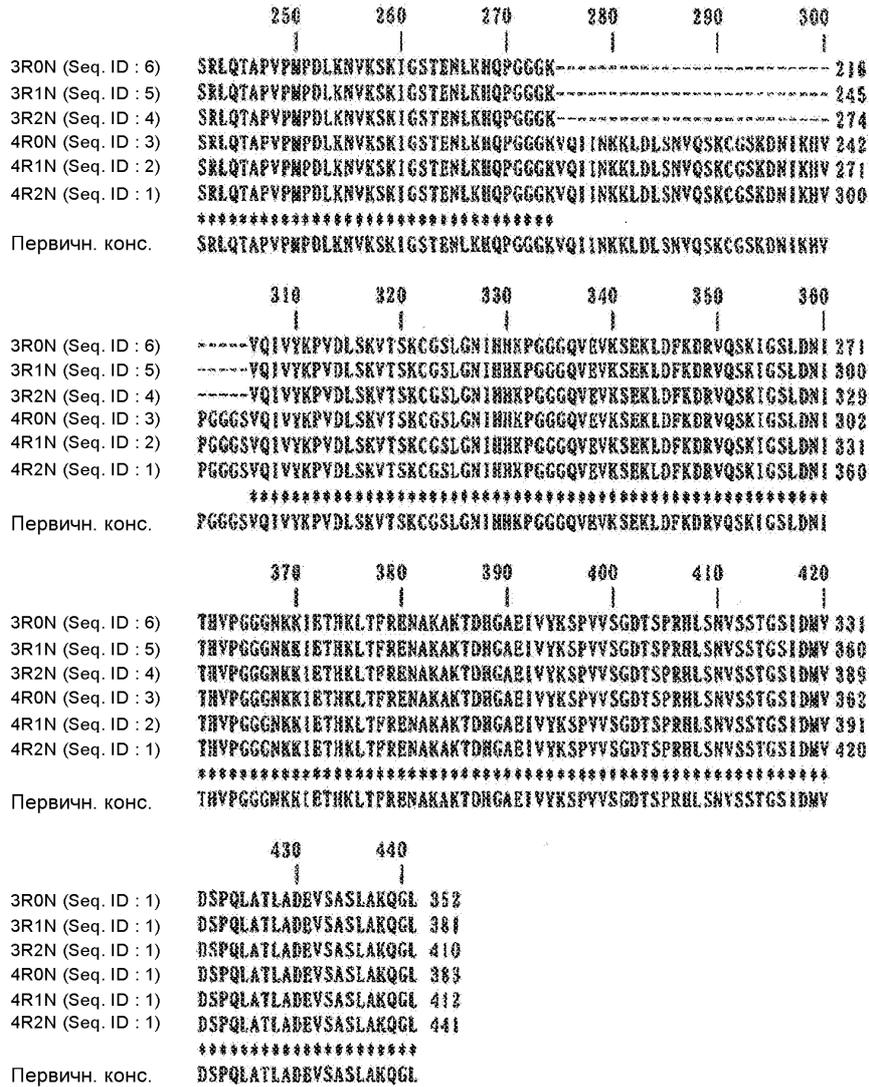
15. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, где отношение аффинности связывания указанного антитела с фосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 8 к аффинности связывания указанного антитела с нефосфорилированным пептидом SEQ ID NO: 69 составляет по меньшей мере около 40 к 1.

16. Применение гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.13 для получения лекарственного средства для лечения таупатии у пациента.

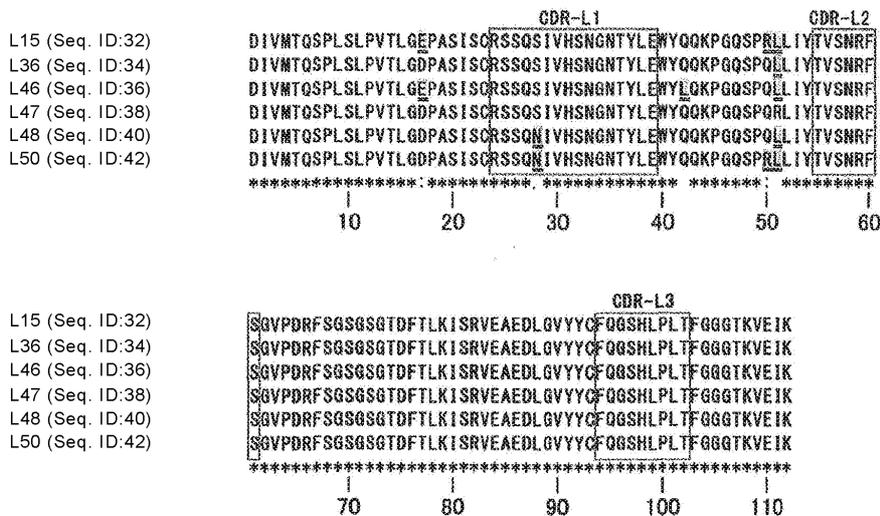
17. Применение по п.16, где таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, кортикобазальной дегенерации, прогрессирующего надъядерного паралича, болезни Пика, аргирофильной зернистой деменции (болезни аргирофильного зерна), множественной системной таупатии с деменцией (MSTD), лобно-височной деменции с паркинсонизмом, сцепленной с хромосомой 17 (FTDP-17), деменции с нейрофибриллярными клубками, диффузными нейрофибриллярными клубками с кальцификацией (DNTC), таупатии белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI), лобно-височной лобарной дегенерации с тау-позитивными включениями (FTLD-тау), последствий энцефалита Экономо и подострого склерозирующего панэнцефалита и энцефалопатии боксеров.



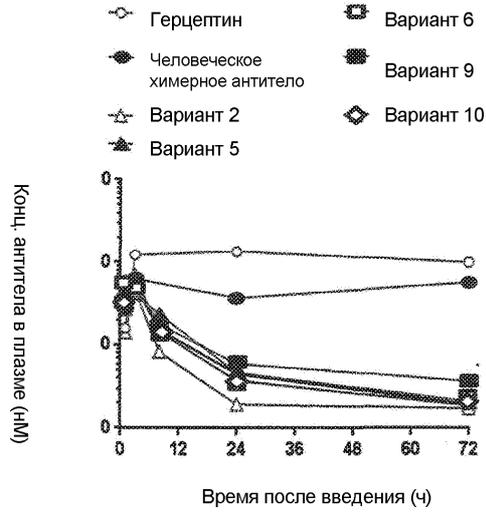
Фиг. 1А



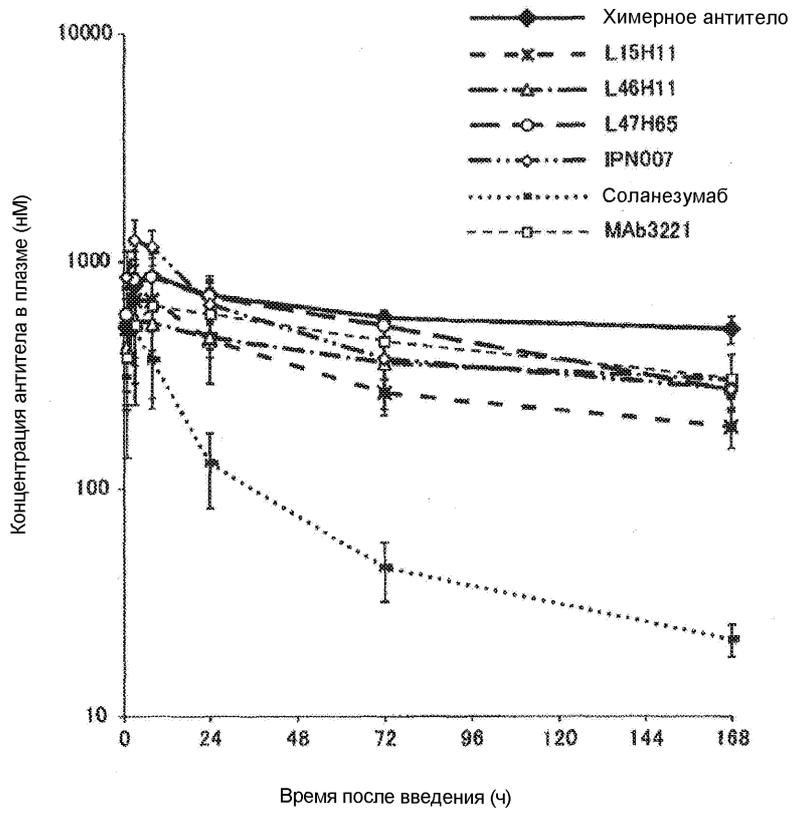
Фиг. 1B



Фиг. 2A

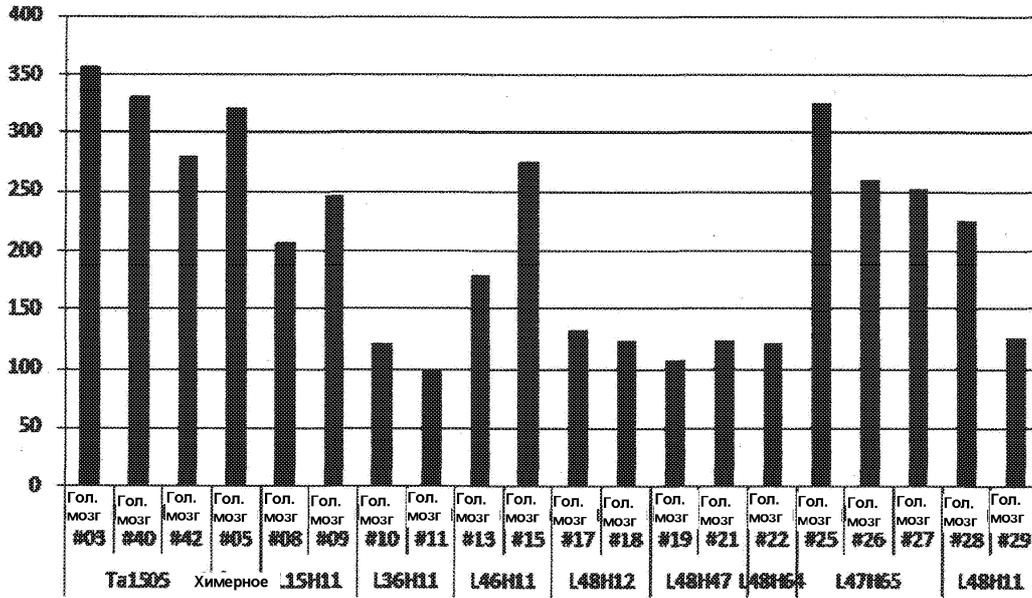


Фиг. 5А

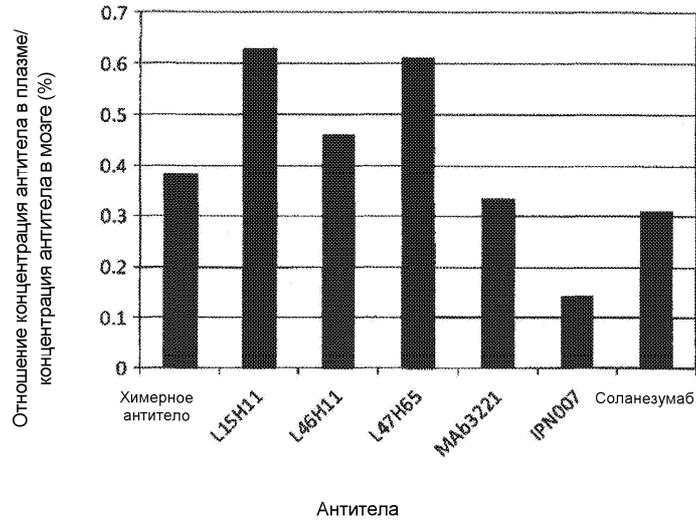


Фиг. 5В

Концентрация антител в гомогенате мозга [пМ]

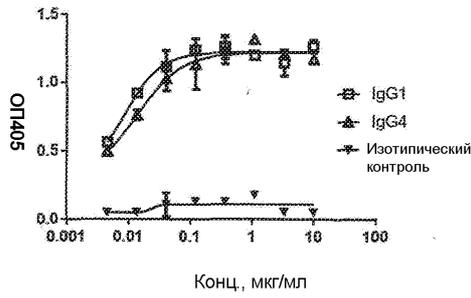


Фиг. 6А



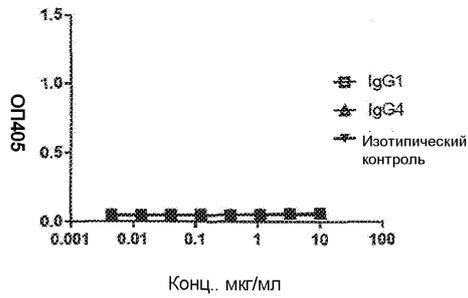
Фиг. 6В

Связывание химерных антител Ta1505 с фосфорилированным пептидом



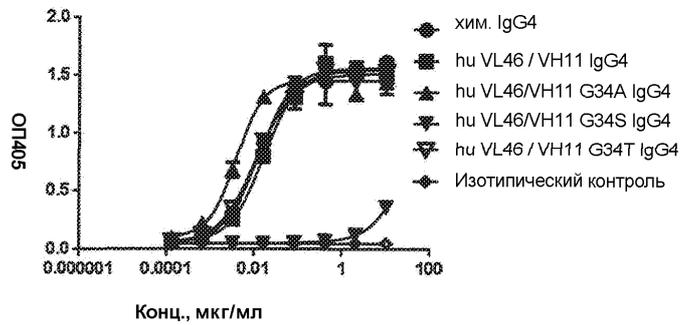
Фиг. 8С

Связывание химерных антител Ta1505 с нефосфорилированным пептидом



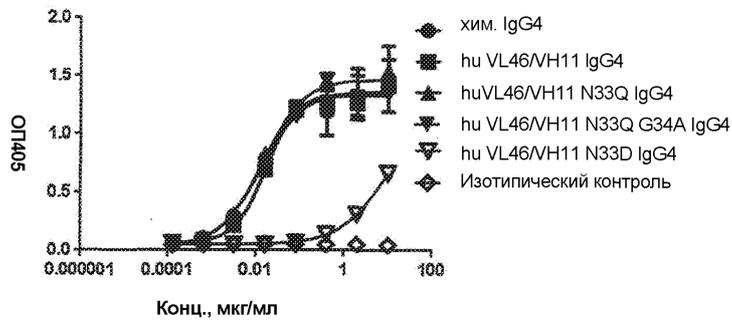
Фиг. 8D

Связывание с пептидом pS413



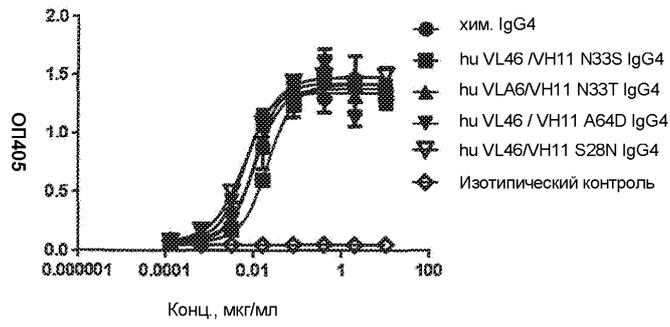
Фиг. 9А

Связывание с пептидом PS413

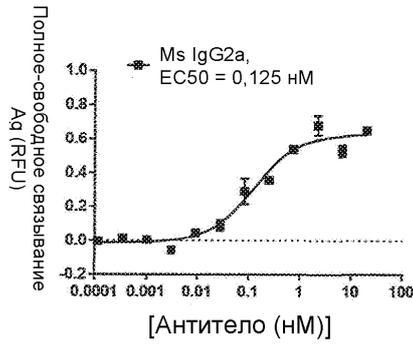


Фиг. 9В

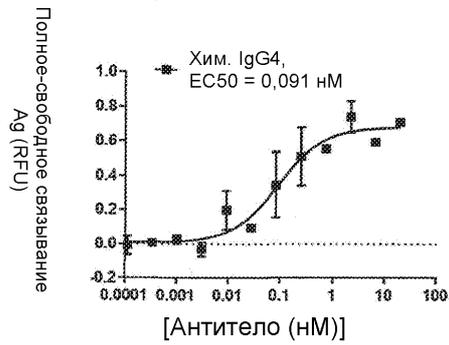
Связывание с пептидом pS413



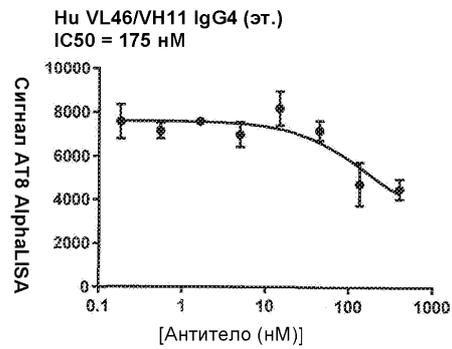
Фиг. 9С



Фиг. 10А

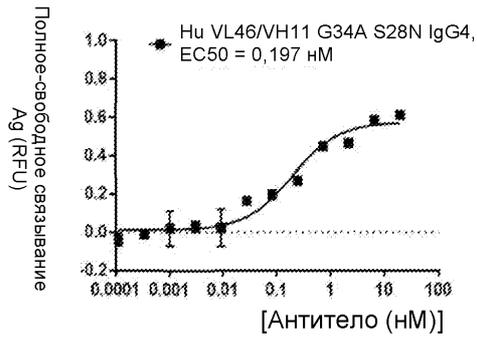


Фиг. 10В

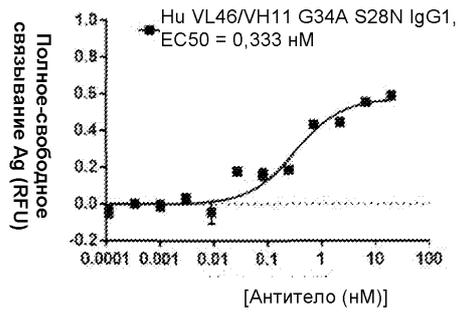


Фиг. 10С

048178



Фиг. 10D



Фиг. 10E

>Ta1505-VL00-мышинное, SEQ ID NO:84

DILMTQTPLSLPVSILGDAQISCRSSQNIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKVLITYTVSNRFSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHLPLTFGGGKLEIK

vICDR1 RSSQNIIVHSNGNTYLE SEQ ID NO:81

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGSHLPLT SEQ ID NO:83

>Ta1505-VL46 SEQ ID NO:103

DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHLPLTFGGGKVEIK

vICDR1 RSSQSIIVHSNGNTYLE SEQ ID NO:91

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGSHLPLT SEQ ID NO:83

>Ta1505-VL47 SEQ ID NO:104

DIVMTQSPLSLPVTLGDPASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYQKPGQSPQRLIYTVSNRFSVGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHLPLTFGGGKVEIK

vICDR1 RSSQSIIVHSNGNTYLE SEQ ID NO:92

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGSHLPLT SEQ ID NO:83

Фиг. 11A

>Ta1505-VL46_G34A SEQ ID NO:105
 DIVMTQSP~~LSLP~~VTLGEPASISCRSSQSI~~VHSN~~NANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS~~GV~~PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS~~HLPL~~TFGGGTKVEIK

vICDR1 RSSQSI~~VHSN~~NANTYLE SEQ ID NO:93

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGS~~HLPL~~T SEQ ID NO:83

>Ta1505-VL46_G34S SEQ ID NO:106
 DIVMTQSP~~LSLP~~VTLGEPASISCRSSQSI~~VHSN~~SNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS~~GV~~PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS~~HLPL~~TFGGGTKVEIK

vICDR1 RSSQSI~~VHSN~~SNTYLE SEQ ID NO:94

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGS~~HLPL~~T SEQ ID NO:83

>Ta1505-VL46_G34T SEQ ID NO:107
 DIVMTQSP~~LSLP~~VTLGEPASISCRSSQSI~~VHSN~~TNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS~~GV~~PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS~~HLPL~~TFGGGTKVEIK

vICDR1 RSSQSI~~VHSN~~TNTYLE SEQ ID NO:95

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGS~~HLPL~~T SEQ ID NO:83

>Ta1505-VL46_N33Q SEQ ID NO:108
 DIVMTQSP~~LSLP~~VTLGEPASISCRSSQSI~~VHS~~QGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS~~GV~~PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS~~HLPL~~TFGGGTKVEIK

vICDR1 RSSQSI~~VHS~~QGNTYLE SEQ ID NO:96

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

Фиг. 11B

vICDR3 FQGS~~HLPL~~T SEQ ID NO:83

>Ta1505-VL46_N33Q_G34A SEQ ID NO:109
 DIVMTQSP~~LSLP~~VTLGEPASISCRSSQSI~~VHS~~QANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS~~GV~~PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS~~HLPL~~TFGGGTKVEIK

vICDR1 RSSQSI~~VHS~~QANTYLE SEQ ID NO:97

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGS~~HLPL~~T SEQ ID NO:83

>Ta1505-VL46_N33D SEQ ID NO:110
 DIVMTQSP~~LSLP~~VTLGEPASISCRSSQSI~~VHS~~DGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS~~GV~~PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS~~HLPL~~TFGGGTKVEIK

vICDR1 RSSQSI~~VHS~~DGNTYLE SEQ ID NO:98

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGS~~HLPL~~T SEQ ID NO:83

>Ta1505-VL46_N33S SEQ ID NO:111
 DIVMTQSP~~LSLP~~VTLGEPASISCRSSQSI~~VHS~~SGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS~~GV~~PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS~~HLPL~~TFGGGTKVEIK

vICDR1 RSSQSI~~VHS~~SGNTYLE SEQ ID NO:99

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGS~~HLPL~~T SEQ ID NO:83

>Ta1505-VL46_N33T SEQ ID NO:112
 DIVMTQSP~~LSLP~~VTLGEPASISCRSSQSI~~VHS~~TGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS~~GV~~PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS~~HLPL~~TFGGGTKVEIK

Фиг. 11C

vICDR1 RSSQIVHSTGNNTYLE SEQ ID NO:100

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGSHLPLT SEQ ID NO:83

>Ta1505-VL46_S28N SEQ ID NO:113

DIVMTQSP^{LS}LPVTLGEPASISCRRSSQIVHSTGNNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS^{GV}PDFRFS^{GS}SGSDFTLTKISRVEAEDLG^{VV}YCFQGS^{HL}PLTFGGG^{TK}VEIK

vICDR1 RSSQIVHSTGNNTYLE SEQ ID NO:101

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGSHLPLT SEQ ID NO:83

*Ta1505-VL46_G34A_S28N SEQ ID NO:114

DIVMTQSP^{LS}LPVTLGEPASISCRRSSQIVHSTGNNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS^{GV}PDFRFS^{GS}SGSDFTLTKISRVEAEDLG^{VV}YCFQGS^{HL}PLTFGGG^{TK}VEIK

vICDR1 RSSQIVHSTGNNTYLE SEQ ID NO:102

vICDR2 TVSNRFS SEQ ID NO:82

vICDR3 FQGSHLPLT SEQ ID NO:83

>Ta1505-VH00-мышинное, SEQ ID NO:89

EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFANSFALNWVRQAPGKLEWVWHIRSKTNNYATFYADSVKDRFTVSRDSDSQSMVYLQMNNLKTEDTGIYCVRRRGPRDS
WFGYWGQGLTVTSSA

vICDR1 SFALN SEQ ID NO:86

vICDR2 HIRSKTNNYATFYADSVKD SEQ ID NO:87

vICDR3 RGPRDSWFGY SEQ ID NO:88

Фиг. 11D

>Ta1505-VH11 SEQ ID NO:116

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFANSFALNWVRQAPGKLEWVWHIRSKTNNYATFYAASVKDRFTVSRDSDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRRRGPRDS
WFGYWGQGLTVTSS

vhCDR1 SFALN SEQ ID NO:86

vhCDR2 HIRSKTNNYATFYAASVKD SEQ ID NO:115

vhCDR3 RGPRDSWFGY SEQ ID NO:88

>Ta1505-VH65 SEQ ID NO:117

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFANSFALNWVRQAPGKLEWVWHIRSKTNNYATFYAASVKDRFTVSRDSDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRRRGPRDSW
FGYWGQGLTVTSS

vhCDR1 SFALN SEQ ID NO:86

vhCDR2 HIRSKTNNYATFYAASVKD SEQ ID NO:115

vhCDR3 RGPRDSWFGY SEQ ID NO:88

Фиг. 11E

>Human_IgG1_P01857 SEQ ID NO:135

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK

>Human_IgG1_P01857_L234A_L235A SEQ ID NO:136

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
PAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK

>Human_IgG1_P01857_L234A_L235A_D265S SEQ ID NO:137

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
PAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK

>Human_IgG1_YTE_P01857_(M252Y_S254T_T256E) SEQ ID NO:138

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLytRePEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK

>Human_IgG1_N297A_P01857 SEQ ID NG:139

Фиг. 12A

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK

>Human_IgG1_N297Q_P01857 SEQ ID NO:140

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYqSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK

>P01859_Human_IgG2 SEQ ID NO:141

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPA
PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSRDEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK

>P01861_Human_IgG4 SEQ ID NO:142

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPPCPCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGQNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGGK

>Human_IgG4_S228P_P01861 SEQ ID NO:143

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPPCPCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGQNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGGK

Фиг. 12B

Константный домен легкой цепи каппа человека SEQ ID NO:79

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Константный домен легкой цепи лямбда человека SEQ ID NO:80

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKYYASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Фиг. 12C

H11 HC IgG1: SEQ ID NO:144

EVQLVESGGGLVQP...
WFGYWGQGLTVTVSS/ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS...
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H11 Human_IgG1_L234A_L235A SEQ ID NO: 145

EVQLVESGGGLVQP...
WFGYWGQGLTVTVSS/ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS...
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H11 Human_IgG1_L234A_L235A_D265S SEQ ID NO:146

EVQLVESGGGLVQP...
WFGYWGQGLTVTVSS/STKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS...
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVsVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H11 Human_IgG1_YTE_(M252Y_S254T_T256E) SEQ ID NO:147

Фиг. 13A

EVQLVESGGGLVQP...
WFGYWGQGLTVTVSS/STKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS...
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLyitRePEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H11 Human_IgG1_N297A SEQ ID NO:148

EVQLVESGGGLVQP...
WFGYWGQGLTVTVSS/ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS...
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H11 Human_IgG1_N297Q SEQ ID NO:149

EVQLVESGGGLVQP...
WFGYWGQGLTVTVSS/STKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS...
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYqSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H11 Human_IgG2 SEQ ID NO:150

EVQLVESGGGLVQP...
WFGYWGQGLTVTVSS/ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS...
DKTVERKCCVCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 13B

H11 Human_IgG4 SEQ ID NO:151

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFALN~~WVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKDR~~FTVSRDSDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSW
WFGYWGQGLTVTVSS/STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVDHKPSNTKVDK
RVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLEPSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

H11 Human_IgG4_S228P SEQ ID NO:152

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFALN~~WVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKDR~~FTVSRDSDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSW
WFGYWGQGLTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVDHKPSNTKVDK
DKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALH
HNHYTQKSLSLSPGK

H65 Human_IgG1 SEQ ID NO:153

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFANFSFALN~~WVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKDR~~FTVSRDSDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSW
FGYWGQGLTVTVSS/STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

H65 Human_IgG1_P01857_L234A_L235A SEQ ID NO:154

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFANFSFALN~~WVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKDR~~FTVSRDSDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSW
FGYWGQGLTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALH

Фиг. 13C

VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALH
HNHYTQKSLSLSPGK

H65 Human_IgG1_L234A_L235A_D265S SEQ ID NO:155

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFANFSFALN~~WVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKDR~~FTVSRDSDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSW
FGYWGQGLTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALH
HNHYTQKSLSLSPGK

H65 Human_IgG1_YTE_(M252Y_S254T_T256E) SEQ ID NO:156

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFANFSFALN~~WVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKDR~~FTVSRDSDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSW
FGYWGQGLTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLytRePEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

H65 Human_IgG1_N297A SEQ ID NO:157

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFANFSFALN~~WVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKDR~~FTVSRDSDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSW
FGYWGQGLTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALH
HNHYTQKSLSLSPGK

H65 Human_IgG1_N297Q_SEQ ID NO:158

Фиг. 13D

EVQLVESGGGLVQP...
EVQLVESGGGLVQP...
EVQLVESGGGLVQP...

H65 Human_IgG2 SEQ ID NO:159

EVQLVESGGGLVQP...
EVQLVESGGGLVQP...
EVQLVESGGGLVQP...

H65_Human_IgG4 SEQ ID NO:160

EVQLVESGGGLVQP...
EVQLVESGGGLVQP...
EVQLVESGGGLVQP...

H65 Human_IgG4_S228P_P01861 SEQ ID NO:161

EVQLVESGGGLVQP...
EVQLVESGGGLVQP...
EVQLVESGGGLVQP...

Фиг. 13E

VL46_каппа SEQ ID NO:162

DIVMTQSP...
/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV...

VL46_лямбда SEQ ID NO:163

DIVMTQSP...
/GQPKAAPSVTLFPPSDEQLKANKATL...

VL47_каппа SEQ. ID NO:164

DIVMTQSP...
K/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV...

VL47_лямбда SEQ ID NO:165

DIVMTQSP...
K/ GQPKAAPSVTLFPPSDEQLKANKATL...

VL46_G34A_каппа SEQ ID NO: 166

DIVMTQSP...
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV...

VL46_G34A_лямбда SEQ ID NO:167

DIVMTQSP...
GQPKAAPSVTLFPPSDEQLKANKATL...

VL46_G34S_каппа SEQ ID NO: 168

DIVMTQSP...
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV...

Фиг. 14A

VL46_G34S лямбда SEQ ID NO: 169

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSNSNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS

SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

VL46_G34T капна SEQ ID NO: 170

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSNTNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VL46_G34T лямбда SEQ ID NO:171

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSNTNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS

SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

VL46_N33Q капна SEQ ID NO:172

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSQNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
/ RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VL46_N33Q лямбда SEQ ID NO:173

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSQNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
/ GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS

SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

VL46_N33Q_G34A капна SEQ ID NO:174

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSQANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
/ RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VL46_N33Q_G34A лямбда SEQ ID NO:175

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSQANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
/ GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS

SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Фиг. 14B

VL46_N33D капна SEQ ID NO:176

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSDGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
/ RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VL46_N33D лямбда SEQ ID NO:177

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSDGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
/ GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS

SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

VL46_N33S капна SEQ ID NO:178

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSSGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VL46_N33S лямбда SEQ ID NG:179

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSSGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS

SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

VL46_N33T капна SEQ ID NO:180

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VL46_N33T лямбда SEQ ID NO:181

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS

SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

VL46_S28N капна SEQ ID NO:182

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQNIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
/ RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Фиг. 14C

VL46_S28N лямбда SEQ ID NO:183

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQNIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
/ GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS

SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

*V146_G34A_S28N капна SEQ ID NO: 184

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQNIVHSNANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
/ RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VL46_G34A_S28N лямбда SEQ ID NO: 185

DIVMTQSPSLPVTLGEPAISICRSSQNIVHSNANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK/
/ GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS

SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Фиг. 14D

Вариабельный легкий домен/вариабельный тяжелый домен	VH11	VH65
VL46-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL47-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL47-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_G34A-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_G34A-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_G34S-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_G34S-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_G34T-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_G34T-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_N33Q-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_N33Q-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
V146_N33Q_G34A-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46-N33Q-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_N33D-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_N33D-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_N33S-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_N33S-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_N33T-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_N33T-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_S28N-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_S28N-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_G34A_S28N-каппа	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
VL46_G34A_S28N-лямбда	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J

Фиг. 15



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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