

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035932**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.02

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

(21) Номер заявки
201591020

(22) Дата подачи заявки
2013.12.20

(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИ-ТАУ АНТИТЕЛА

(31) **61/745,410**

(32) **2012.12.21**

(33) **US**

(43) **2015.12.30**

(86) **PCT/US2013/076952**

(87) **WO 2014/100600 2014.06.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙОДЖЕН МА ИНК. (US);
БАЙОДЖЕН ИНТЕРНЭШНЛ
НЕЙРОСАЙЕНЗ ГМБХ (CH)

(72) Изобретатель:
Вейнреб Пол Х. (US), Чэнь Фэн (CH),
Гарбер Эллен А. (US), Гримм Ян,
Монтрасио Фабио (CH)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **US-A1-2012087861**
WO-A2-2010144711
US-A1-2008050383
WO-A2-2012106363
WO-A2-2010142423
WO-A1-9308302

JEAN C. AUGUSTINACK ET AL.: "Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease", ACTA NEUROPATHOLOGICA, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 103, no. 1, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 26-35, XP002625811, ISSN: 0001-6322, DOI: 10.1007/S004010100423 [retrieved on 2001-10-26], the whole document

ALLAL BOUTAJANGOUT ET AL.: "Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 118, no. 4, 1 August 2011 (2011-08-01), pages 658-667, XP055081677, ISSN: 0022-3042, DOI:10.1111/j.1471-4159.2011.07337.x, the whole document

(57) Изобретение относится к новым тау-специфичным человеческим антителам, а также их фрагментам, которые распознают белок тау, включая патологически фосфорилированный тау и агрегированные формы тау. Предложены тау-специфические антитела, содержащие участки CDR VH 1, 2 и 3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, соответственно, и участки CDR VL 1, 2 и 3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90, соответственно, а также их антигенсвязывающие фрагменты. Дополнительно предложены композиции, содержащие такие антитела, способы лечения нейродегенеративной таупатии или аномального накопления или отложения тау в центральной нервной системе с применением таких антител или композиций, а также полинуклеотиды, векторы, клетки и способы для получения антител и способ диагностирования нейродегенеративной таупатии.

B1**035932****035932****B1**

Уровень техники Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к новым тау-специфичным связывающим молекулам, в частности человеческим антителам, а также их фрагментам, производным и вариантам, которые распознают белок тау, включая патологически фосфорилированный тау и агрегированные формы тау. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим и диагностическим композициям, содержащим такие связывающие молекулы, антитела и их мимики, имеющие ценность как в качестве диагностических инструментов для выявления тау и токсичных видов тау в плазме крови и ЦСЖ, так и в стратегиях пассивной вакцинации для лечения нейродегенеративных таупатий, таких как болезнь Альцгеймера (БА), комплекс амиотрофический боковой склероз/паркинсонизм-деменция (АБС-ПД), аргирофильная гранулярная деменция (АГД), амилоидная ангиопатия британского типа, церебральная амилоидная ангиопатия, кортикобазальная дегенерация (КБД), болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), деменция боксеров, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, синдром Дауна, лобно-височная деменция, лобно-височная деменция с паркинсонизмом, сцепленная с хромосомой 17 (ЛВДП-17), лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца, миозит с включенными тельцами, множественная системная атрофия, миотоническая дистрофия, болезнь Ниманна-Пика типа С (НП-С), негуамская болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, болезнь Пика (БП), постэнцефалитический паркинсонизм, связанная с прионными белками церебральная амилоидная ангиопатия, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), подострый склерозирующий панэнцефалит, деменция с клубками, мультиинфарктная деменция и ишемический инсульт.

Уровень техники

Накопление, модифицирование и агрегация белков являются патологическими аспектами многочисленных нейродегенеративных заболеваний. Патологически модифицированный и агрегированный тау, включая гиперфосфорилированные конформеры тау, являются неизменными признаками таупатий и связаны с тяжестью заболевания.

Тау представляет собой ассоциированный с микротрубочками белок, который экспрессируется в центральной нервной системе и основной функцией которого является стабилизация микротрубочек. Существует шесть основных изоформ тау, которые экспрессируются преимущественно в головном мозге взрослого человека и являются продуктом альтернативного сплайсинга одного гена. В патологических условиях тау становится гиперфосфорилированным, что приводит к прекращению связывания тубулина и дестабилизации микротрубочек с последующей агрегацией и отложением тау в патогенных нейрофибриллярных клубках. Связанные с тау нарушения - имеющие общее название нейродегенеративных таупатий - представляют собой группу нарушений сворачивания белков, включая, помимо прочего, болезнь Альцгеймера (БА), прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Пика, кортикобазальную дегенерацию, ЛВДП-17. Сообщалось, что более 40 мутаций в гене тау связаны с наследственной лобно-височной деменцией, что демонстрирует, что мутаций гена тау достаточно для появления нейродегенерации (Cairns et al., *Am. J. Pathol.* 171 (2007), 227-40). Исследования на трансгенных мышах и клеточных культурах свидетельствуют о том, что при БА причиной тау-патологии может быть патологический каскад, в котором Аβ предшествует тау (Götz et al., *Science* 293 (2001), 1491-1495). В другом открытии, однако, указана модель, включающая двойной путь, в котором оба каскада происходят независимо друг от друга (van de Nes et al., *Acta Neuropathol.* 111 (2006), 126-138). Иммуноterapiи, основанные на нацеливании на бета-амилоидный пептид при БА, продемонстрировали обнадеживающие результаты в животных моделях и оказались перспективными в клинических исследованиях. Более поздние данные по аутопсии, полученные от небольшого количества субъектов, дают основание предполагать, что клиренс бета-амилоидных бляшек у пациентов с прогрессирующей БА может быть недостаточным условием для прекращения нарушений когнитивных функций, что подчеркивает потребность в дополнительных терапевтических стратегиях для БА (Holmes et al., *Lancet* 372 (2008), 216-223; Boche et al., *Acta Neuropathol.* 120 (2010), 13-20). После успеха иммунизационной терапии на основе А-бета в трансгенных животных моделях концепцию активной иммуноterapiи расширили на белок тау. Однако было обнаружено, что активная вакцинация мышей дикого типа белком тау индуцирует образование нейрофибриллярных клубков, повреждение аксонов и появление мононуклеарных инфильтратов в центральной нервной системе, сопровождаемое неврологическим дефицитом (Rosenmann et al., *Arch Neurol.* 63 (2006), 1459-1467). Последующие исследования на трансгенных мышинных линиях с применением активной вакцинации фосфорилированными пептидами тау выявили снижение уровней агрегатов тау в головном мозге и замедление прогрессирования поведенческих нарушений (Sigurdsson, J. *Alzheimers. Dis.* 15 (2008), 157-168; Boimel et al., *Exp. Neurol.* 224 (2010), 472-485). Эти открытия подчеркивают потенциальные возможности, а также огромный риск, связанный с нацеленными на тау подходами с применением активной иммуноterapiи. В отношении патологических белков тау срочно необходимы новые терапевтические стратегии, включающие эффективную и безопасную терапию.

Пассивная иммунизация человеческими антителами, полученными от здоровых человеческих субъектов, которые были эволюционно оптимизированы и достигли созревшей аффинности при помощи им-

мунной системы человека, могли бы обеспечить новый перспективный терапевтический подход с высокой вероятностью превосходной эффективности и безопасности.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении описано применение тау-специфического иммунного ответа здоровых человеческих субъектов для выделения природных анти-тау-специфических человеческих моноклональных антител. В частности, эксперименты, проведенные в соответствии с настоящим изобретением, были успешными в отношении выделения моноклональных тау-специфических антител из группы здоровых человеческих субъектов без признаков нейродегенеративной таупатии.

Таким образом, настоящее изобретение относится к человеческим антителам, антигенсвязывающим фрагментам и сходным антигенсвязывающим молекулам, которые способны специфически распознавать тау. Под выражениями "специфически распознавать тау", "антитело, специфическое в отношении тау" и "анти-тау антитело" подразумеваются, в частности, в общем смысле и в совокупности антитела к нативной форме тау или агрегированным либо патологически модифицированным изоформам тау. В данном документе предложены человеческие антитела, избирательные в отношении полноразмерной, патологически фосфорилированной и агрегированной форм.

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует иммунологические связывающие характеристики антитела, характеризуемого тем, что оно содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую участки, определяющие комплементарность, тяжелой цепи (CDR VH) 1, 2 и 3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую участки, определяющие комплементарность, легкой цепи (CDR VL) 1, 2 и 3, причем участки CDR VH 1, 2 и 3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, соответственно, и участки CDR VL 1, 2 и 3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90, соответственно.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела может представлять собой одноцепочечный Fv-фрагмент, F(ab')-фрагмент, F(ab)-фрагмент и F(ab')₂-фрагмент или другой антигенсвязывающий фрагмент. В конкретном варианте реализации изобретения, выше, антитело или его фрагмент представляет собой человеческое антитело изотипа IgG. В альтернативном варианте антитело представляет собой химерное человеческо-мышинное или муринизированное антитело, причем последнее является исключительно полезным для применения в диагностических методах и исследованиях на животных.

Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитело согласно настоящему изобретению или его активные фрагменты либо агонисты и когнатные молекулы, или, как альтернативный вариант, антагонисты перечисленных компонентов, и к иммунотерапевтическим и иммунодиагностическим способам, в которых применяются такие композиции, в предотвращении, диагностировании или лечении таупатии, при этом эффективное количество композиции вводят нуждающемуся в этом пациенту.

Естественно, настоящее изобретение распространяется на иммортализованный человеческий В-лимфоцит памяти и В-клетку, соответственно, который вырабатывает антитело, имеющее отличительные и уникальные характеристики, как определено ниже.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим по меньшей мере одну вариабельную область цепи иммуноглобулина антитела согласно изобретению. В одном варианте реализации изобретения указанная вариабельная область содержит определяющие комплементарность участки (CDR), причем участки CDR VH 1, 2 и 3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, соответственно, и участки CDR VL 1, 2 и 3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90, соответственно.

Соответственно, настоящее изобретение также включает векторы, содержащие указанные полинуклеотиды, и клетки-хозяева, трансформированные ими, а также их применение для получения антитела и фрагментов антител, специфических в отношении тау. Способы и методы рекомбинантного получения антител и их мимиков, а также способы отбора конкурирующих связывающих молекул, например антител, известны в данной области техники. При этом, как описано в данном документе, в частности, в отношении терапевтических применений на людях антитело согласно настоящему изобретению представляет собой человеческое антитело в том смысле, что применение указанного антитела практически не сопровождается иммунным ответом, направленным против такого антитела, который наблюдается в случае химерных и даже гуманизированных антител.

Кроме того, в данном документе раскрыты композиции и способы, которые можно применять для выявления тау в образцах. Описанные анти-тау антитела можно применять для исследования человеческой крови, ЦСЖ и мочи на наличие в образцах тау, например, используя методы анализа на основе ELISA или адаптированные в отношении поверхности методы. Раскрытые в данном документе способы и композиции могут помочь в диагностировании нейродегенеративных таупатий, таких как болезнь Альцгеймера, и могут применяться для мониторинга прогрессирования заболевания и терапевтической эффективности.

Следовательно, конкретной целью настоящего изобретения является предложение способа лечения, диагностирования или предотвращения нейродегенеративной таупатии, такой как болезнь Альцгеймера,

комплекс амиотрофический боковой склероз/паркинсонизм-деменция, аргирофильная гранулярная деменция, амилоидная ангиопатия британского типа, церебральная амилоидная ангиопатия, кортикобазальная дегенерация, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменция боксеров, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, синдром Дауна, лобно-височная деменция, лобно-височная деменция с паркинсонизмом, сцепленная с хромосомой 17, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца, миозит с включенными тельцами, множественная системная атрофия, миотоническая дистрофия, болезнь Ниманна-Пика типа С, негуамская болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, болезнь Пика, постэнцефалитический паркинсонизм, связанная с прионными белками церебральная амилоидная ангиопатия, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменция с клубками, мультиинфарктная деменция и ишемический инсульт. Указанные способы включают введение субъекту эффективной концентрации человеческого антитела или производного антитела, причем указанное антитело нацелено на тау.

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения станут очевидны из нижеприведенного описания и примеров.

Краткое описание графических материалов/фигур

Фиг. 1 - аминокислотные и нуклеотидные последовательности варибельной области, т.е. тяжелой цепи и легкой лямбда-цепи человеческих антител NI-105.4E4 (A), NI-105.24B2 (B) и NI-105.4A3 (C). Указаны каркасные (FR) и определяющие комплементарность области (CDR), при этом CDR подчеркнуты. Из-за стратегии клонирования аминокислотная последовательность в N-конце тяжелой цепи и легкой цепи потенциально может содержать праймер-индуцированные изменения в FR1, которые, однако, не оказывают существенного влияния на биологическую активность антитела. Чтобы получить консенсусное человеческое антитело, нуклеотидные и аминокислотные последовательности оригинального клона выравнивали и перестраивали в соответствии с последовательностями варибельной области подходящей человеческой зародышевой линии из базы данных; см., например, Vbase (<http://vbase.mrc-sre.cam.ac.uk/>), находящуюся на хостинге MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK). Те аминокислоты, которые, как считается, могут потенциально отличаться от последовательности консенсусной зародышевой линии из-за ПЦР-праймера и, следовательно, были замещены в аминокислотной последовательности, выделены жирным.

Фиг. 2 - NI-105.4E4 связывается с нейрофибриллярными клубками (НФК), дистрофическими нейритами и нейропильными нитями в пораженном БА мозге и у мышей, экспрессирующих человеческий TauP301L. Окрашивание NI-105.4E4 выявило НФК и нейропильные нити в пораженном БА мозге (A), без существенного связывания с тау в мозге здорового контрольного субъекта (B). В случае TauP301L трансгенной мыши (E-I) NI-105.4E4 прочно связывается со сходными с патологическим тау НФК (E, F и H), нейропильными нитями (E и G) и дистрофическими нейритами (E и H). Кроме того, NI-105.4E4 также выявляет тау-агрегаты на стадии, предвещающей появление клубков (I). NI-105.4E4 связывается с НФК, дистрофическими нейритами и нейропильными нитями в случае трансгенной мыши, экспрессирующей человеческий БПА со Шведской и Арктической мутацией и TauP301L; стрелкой указана бета-амилоидная бляшка, окруженная дистрофическими нейритами, распознаваемыми NI-105.4E4 (J). Само по себе вторичное антитело не генерирует сигнал как в случае БА человека (C), так и в случае здорового контрольного субъекта (D).

Фиг. 3 - анализ иммунореактивности тканевых бляшек (TAPIR). Нейрофибриллярные клубки окрашивали анти-фосфо-тау антителом AT100 или сыворотками, выделенными из здоровых взрослых субъектов.

Фиг. 4 - показано схематическое изображение эпитопов NI-105.4E4 и NI-105.4A3 и эпитопов, традиционно применяемых коммерчески доступных мышиных моноклональных антител к тау. Человеческое антитело NI-105.4E4 нацелено на уникальный эпитоп, который содержит два линейных полипептида, один из которых расположен в связывающем домене микротрубочки (R4) тау, который замаскирован в случае физиологического ассоциированного с микротрубочками тау. Tau-12 (Covance, California, U.S.A.), HT7, AT8, AT180 (Thermo Scientific, U.S.A.); PHF1 (Lewis et al., Science 293(2001), 1487-1491).

Фиг. 5 - уровни человеческого IgG в плазме крови мышей после внутрибрюшинного введения 30 мг/кг человеческого анти-тау антитела NI-105.4E4 или NI-105.4A3.

Фиг. 6 - уровни человеческого IgG в гомогенате головного мозга мышей после внутрибрюшинного введения 30 мг/кг человеческого анти-тау антитела NI-105.4E4 или NI-105.4A3.

Фиг. 7 - аминокислотная последовательность варибельных областей тяжелой цепи и легкой цепи человеческих анти-тау антител (A) NI-105.17C1, (B) NI-105.6C5, (C) NI-105.29G10, (D) NI-105.6L9, (E) NI-105.40E8, (F) NI-105.48E5, (G) NI-105.6E3, (H) NI-105.22E1, (I) NI-105.26B12, (J) NI-105.12E12, (K) NI-105.60E7, (L) NI-105.14E2, (M) NI-105.39E2, (N) NI-105.19C6 и (O) NI-105.9C4. Определяющие комплементарность области (CDR) подчеркнуты.

Фиг. 8(A) - связывание ch17C1, ch17C1(N31Q) mIgG2a и ch17C1(N31Q) mIgG1 Agly с рекомбинантным тау при проведении анализа ELISA. (B) Сравнение связывания рекомбинантного тау ch17C1(N31Q) mIgG2a и ch17C1(N31Q, I48V) mIgG2a при проведении анализа ELISA.

Фиг. 9 - сравнение связывания рекомбинантного тау NI-105.40E8 hIgG1 и NI-105.40E8(R104W) hIgG1 при проведении анализа ELISA.

Фиг. 10 - связывание человеческих анти-тау антител NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6C5 и NI-105.17C1 (I48V) с патологически агрегированным тау в пораженном БА головном мозге в случае трансгенной мышинной модели таупатии. Репрезентативные изображения связывания человеческого анти-тау антитела с патологическими агрегатами тау в мозге, пораженном болезнью Альцгеймера (БА), и в мозге трансгенной мыши с таупатией (Тг). Контрольные образцы ткани получали из мозга психически здорового субъекта (Ктр) или мышцы дикого типа (Дт).

Фиг. 11 - проникновение человеческих анти-тау антител NI-105.6C5 или NI-105.6E3 в мозг TauP301L мышей, "тг" обозначает репрезентативные срезы, полученные от трансгенных животных, как обработанных, так и необработанных, а "дт" обозначает необработанное нетрансгенное животное. Масштабная метка: 50 мкм.

Фиг. 12 - влияние долговременной обработки TauP301L мышей ch4E4(N30Q) и ch17C1(N31Q). Общие уровни человеческого тау (А), человеческого pS199 тау (В), человеческого pT231 тау (С) и человеческого pT181 тау (D) в растворимой и нерастворимой фракции экстрактов белков мозга количественно оценивали при помощи коммерческого ELISA.

Фиг. 13 - растворимый и нерастворимый человеческий тау в случае TauP301L мышей, обработанных ch17C1(N31Q) и ch4E4(N30Q), выявляемый вестерн-блоттингом.

Фиг. 14 - средние концентрации лекарственного препарата в плазме крови для животных, обработанных ch17C1(N31Q) и ch4E4(N30Q), через 24 ч после в.б. введения последней дозы. Средние концентрации лекарственного препарата в плазме крови для ch17C1(N31Q) и ch4E4(N30Q) составляли 145 и 200 мкг/мл соответственно.

Фиг. 15 - пространственную кратковременную память у TauP301L мышей, обработанных ch17C1(N31Q) и ch4E4(N30Q), оценивали в двух испытаниях с Y-лабиринтом.

Подробное описание изобретения

I. Определения.

Нейродегенеративные таупатии представляют собой группу нейродегенеративных нарушений, которые характеризуются общими патологическими изменениями, связанными с наличием внутриклеточных агрегатов аномальных филаментов, которые состоят главным образом из патологически гиперфосфорилированного тау в нейронах и/или глиальных клетках. Клинические признаки таупатий гетерогенны и характеризуются деменцией и/или двигательными синдромами. Прогрессирующее накопление филаментозных включений тау может стать причиной нейрональной и глиальной дегенерации в комбинации с другими отложениями, такими как, например, бета-амилоид при болезни Альцгеймера, или патогенная форма стопы, что объясняется мутациями в гене тау, которые связаны с семейными формами лобно-височной деменции и паркинсонизмом, сцепленным с хромосомой 17 (ЛВДП-17). Из-за гетерогенности клинических проявлений можно составить потенциально не исчерпывающий список таупатических заболеваний, включающий болезнь Альцгеймера, комплекс амиотрофический боковой склероз/паркинсонизм-деменция, аргирофильную гранулярную деменцию, амилоидную ангиопатию британского типа, церебральную амилоидную ангиопатию, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию боксеров, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, синдром Дауна, лобно-височную деменцию, лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца, миозит с включенными тельцами, множественную системную атрофию, миотоническую дистрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, негуамскую болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, болезнь Пика, постэнцефалитический паркинсонизм, связанную с прионными белками церебральную амилоидную ангиопатию, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с клубками, мультиинфарктную деменцию и ишемический инсульт; для ознакомления см., например, Lee et al., Annu. Rev. Neurosci. 24 (2001), 1121-1159, в которой в табл. 1 перечислены уникальные виды таупатий, или Sergeant et al., Bioch. Biophys. Acta 1739 (2005), 179-97, вместе со списком, приведенным на фиг. 2 этой работы.

В этом изобретении термины "тау" употребляются взаимозаменяемо специально для обозначения нативной мономерной формы тау. Также термин "тау" употребляется в целом для определения других конформеров тау, например олигомеров или агрегатов тау. Также термин "тау" употребляется в качестве обозначения всех типов и форм тау. Вследствие альтернативного сплайсинга в головном мозге человека присутствует 6 изоформ тау. Белковые последовательности этих изоформ следующие.

Изоформа фетального тау из 352 ак

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTP
SLEDEAAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQQA
NATRIPAKTPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREPCK
VAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKLVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKP
VDLSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN
KKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTSRHLNSVSTGSIDMVDSPQL
ATLADEVASLAKQGL (SEQ ID NO:1)

Изоформа тау-В из 381 ак

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQPTED
GSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDD
KKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIPAKTPAPKTPSSGEPPKSGDRSG
YSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREPCKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLK
NVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKS
EKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPV
VSGDTSRHLNSVSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL (SEQ ID NO:2)

Изоформа тау-С из 410 ак

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQPTED
GSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAPHTPEIGTTAEAGIGDT
PSLEDEAAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQQA
ANATRIPAKTPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREPCK
KVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKLVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYK
PVDLSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGG
NKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTSRHLNSVSTGSIDMVDSPQ
LATLADEVASLAKQGL (SEQ ID NO:3)

Изоформа тау-Д из 383 ак

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTP
SLEDEAAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQQA
NATRIPAKTPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREPCK
VAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKLVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL
DLNVQSKCGSKDNKIHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVE
VKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVY
KSPVVSAGDTSRHLNSVSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL (SEQ ID
NO:4)

Изоформа тау-Е из 412 ак

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQPTED
GSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDD
KKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIPAKTPAPKTPSSGEPPKSGDRSG
YSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREPCKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLK
NVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLNVQSKCGSKDNKIHVPGGGSVQIVY
KPVDSLKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGG
GNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTSRHLNSVSTGSIDMVDSP
QLATLADEVASLAKQGL (SEQ ID NO:5)

Изоформа тау-Ф из 441 ак

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQPTED
GSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAPHTPEIGTTAEAGIGDT
PSLEDEAAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQQA
ANATRIPAKTPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREPCK
KVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKLVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL
DLNVQSKCGSKDNKIHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVE
VKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVY
KSPVVSAGDTSRHLNSVSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL (SEQ ID
NO:6)

Аминокислотная последовательность тау "дикого типа", представленная изоформой тау-F из 441 ак (SEQ ID NO: 6), также называется "hTau40", "TauF", "Tau-4" или "полноразмерным тау". Аминокислотную последовательность тау можно найти в литературе и соответствующих базах данных; см. Goedert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 4051-4055, Goedert et al., EMBO J. 8(1989), 393-399, Goedert et al., EMBO J. 9(1990), 4225-4230 и GenBank UniProtKB/swissprot: locus TAU_HUMAN, номера доступа P10636-2 (фетальный тау) и от P10636-4 до -8 (изоформы от В до F).

Другой специфической особенностью белка тау является фосфорилирование, которое происходит приблизительно на 30 из 79 потенциальных участках фосфорилирования серина (Ser) и треонина (Thr). Тау является высокофосфорилируемым во время развития головного мозга. Во взрослом состоянии степень фосфорилирования снижается. Некоторые участки фосфорилирования расположены в пределах связывающих микротрубочки доменов тау, и было показано, что повышение фосфорилирования тау негативно влияет на связывание микротрубочек. Например, Ser262 и Ser396, которые расположены в пределах или рядом с мотивами связывания микротрубочек, являясь гиперфосфорилированными в случае белков тау аномально спаренных спиральных филаментов (ССФ или PHF) - основного компонента нейрофибриллярных клубков (НФК) в мозге пораженных БА пациентов. ССФ представляют собой аномально гиперфосфорилированные филаментозные агрегаты белков тау, которые можно окрашивать специфическими анти-тау антителами и выявлять при помощи оптической микроскопии. То же самое относится и к так называемым прямым филаментам тау. ССФ образуют скрученные волокна, состоящие из двух филаментов, закрученных друг вокруг друга с периодичностью, составляющей около 80 нм. Эти патологические признаки обычно называют "тау-патологией", "таупатологией" или "связанной с тау патологией". Более подробное описание нейропатологических признаков таупатий можно найти в Lee et al., Annu. Rev. Neurosci. 24 (2001), 1121-1159 и Götz, Brain. Res. Rev. 35 (2001), 266-286, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Физиологический белок тау стабилизирует микротрубочки в нейронах. Патологическое фосфорилирование приводит к аномальной локализации и агрегации тау, что является причиной дестабилизации микротрубочек и нарушения клеточного транспорта. Агрегированный тау является нейротоксичным *in vitro* (Khlistunova et al., J. Biol. Chem. 281 (2006), 1205-1214). Однако точный перечень нейротоксичных видов остается невыясненным так же, как и механизм(ы), который приводит к смерти нейронов. Агрегаты тау можно наблюдать в виде основного компонента нейрофибриллярных клубков (НФК) в случае многих таупатий, таких как болезнь Альцгеймера (БА), лобно-височные деменции, надъядерный паралич, болезнь Пика, аргирофильная гранулярная болезнь (АГБ), кортикобазальная дегенерация, ЛВДП-17, болезнь Паркинсона, деменция боксеров (обзор можно найти в Gendron and Petrucelli, Mol. Neurodegener. 4:13 (2009)). Кроме этих наблюдений существуют сведения, что тау-опосредованная смерть нейронов может происходить даже в отсутствие образования клубков. Растворимые виды фосфо-тау присутствуют в ЦСЖ (Aluise et al., Biochim. Biophys. Acta. 1782 (2008), 549-558). Агрегаты тау могут переносить состояние с неправильным сворачиванием извне внутрь клетки и перемещаться между совместно культивируемыми клетками (Frost et al., J. Biol. Chem. 284 (2009), 12845-12852).

Кроме того, что они имеют отношение к нейродегенеративным таупатиям, наблюдаемые изменения в фосфорилировании тау во время и после ишемии/реперфузии дают основание предполагать, что тау играет решающую роль в повреждении нейронов и клинической патофизиологии невровакулярных нарушений, таких как ишемический инсульт (Zheng et al., J. Cell. Biochem. 109 (2010), 26-29).

Описанные в данном документе человеческие анти-тау антитела специфически связывают тау и его эпитопы, а также разные конформации тау и его эпитопов. Например, в данном документе описаны антитела, которые специфически связывают тау, полноразмерный тау, патологически модифицированные изоформы тау и агрегаты тау. В контексте данного документа упоминание антитела, которое "специфически связывает", "избирательно связывает" или "предпочтительно связывает" тау, относится к антителу, которое не связывает другие неродственные белки. В одном примере описанное в данном документе антитело к тау может связывать тау или его эпитоп и не демонстрировать связывания, приблизительно в 1,5 раза превышающего фон, в отношении других белков. Антитело, которое "специфически связывает" или "избирательно связывает" конформер тау, относится к антителу, которое не связывает все конформации тау, т.е. не связывает по меньшей мере один конформер тау. Например, в данном документе описаны антитела, которые могут предпочтительно связываться с агрегированными формами тау в пораженной БА ткани. Так как человеческие анти-тау антитела согласно настоящему изобретению были выделены из группы здоровых человеческих субъектов, проявляющих тау-специфический иммунный ответ, антитела к тау согласно настоящему изобретению можно также называть "человеческими аутоантителами", чтобы подчеркнуть, что эти антитела действительно были экспрессированы субъектами, а не были выделены, например, из библиотеки фагов, экспрессирующих человеческий иммуноглобулин, что до настоящего времени было одним из обычных способов получения человекоподобных антител.

Следует отметить, что употребление единственного числа по отношению к объекту подразумевает один или более таких объектов, например подразумевается, что "антитело" относится к одному или более антителам. Следовательно, выражения "один или более" и "по меньшей мере один" могут взаимозаменяемо употребляться в данном документе.

Употребляемый в данном документе термин "полипептид" включает в себя одиночный "полипептид", а также множественные "полипептиды", и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно соединенных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот и не связан с какой-либо определенной длиной продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, употребляемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены в определение "полипептида", а термин "полипептид" может употребляться вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов.

Также подразумевается, что термин "полипептид" относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, включая без ограничений гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификации аминокислотами неприродного происхождения. Полипептид можно получить из природного биологического источника или при помощи рекомбинантной технологии, но он не обязательно должен быть транслирован с определенной нуклеотидной последовательности. Его можно получить любым путем, включая химический синтез.

Полипептид согласно данному изобретению может иметь размер, составляющий около 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более либо 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут обладать определенной трехмерной структурой, хотя они не обязательно обладают такой структурой. Полипептиды с определенной трехмерной структурой называются свернутыми, а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, но могут принимать большое количество разных конформаций, называются несвернутыми. Употребляемый в данном документе термин гликопротеин относится к белку, спаренному с по меньшей мере одним углеводным компонентом, который присоединен к белку посредством кислородсодержащей или азотсодержащей боковой цепи аминокислотного остатка, например остатка серина или остатка аспарагина.

Под "выделенным" полипептидом или его фрагментом, вариантом или производным подразумевается полипептид, который не находится в своем природном окружении. Нет необходимости в каком-либо конкретном уровне очистки. Например, выделенный полипептид может быть удален из своего нативного или природного окружения. Рекомбинантно полученные полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, в контексте данного изобретения считаются выделенными, как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы или частично либо в значительной степени очищены подходящими способами.

Также в качестве полипептидов согласно настоящему изобретению включены фрагменты, производные, аналоги или варианты вышеописанных полипептидов, а также любые их комбинации. Термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог", употребляемые в отношении антител или полипептидов антител согласно настоящему изобретению, включают любые полипептиды, которые сохраняют по меньшей мере некоторые антигенсвязывающие свойства соответствующей нативной связывающей молекулы, антитела или полипептида. Фрагменты полипептидов согласно настоящему изобретению включают протеолитические фрагменты, а также делеционные фрагменты дополнительно к отдельным фрагментам антител, обсуждаемым в другом месте данного документа. Варианты антител и полипептидов антител согласно настоящему изобретению включают вышеописанные фрагменты, а также полипептиды с измененными вследствие аминокислотных замен, делеций или инсерций аминокислотными последовательностями. Варианты могут быть природного и неприродного происхождения. Варианты неприродного происхождения можно получить при помощи известных в данной области техники методов мутагенеза. Вариантные полипептиды могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеции или вставки. Производные тау-специфических связывающих молекул, например антител и полипептидов антител согласно настоящему изобретению, представляют собой полипептиды, которые были изменены таким образом, чтобы обладать дополнительными характеристиками, которых нет у нативного полипептида. Примеры включают слитые белки. В данном документе вариантные полипептиды могут также называться "полипептидными аналогами". Употребляемый в данном документе термин "производное" связывающей молекулы или ее фрагмента, антитела или полипептида антитела относится к рассматриваемому полипептиду, содержащему один или более остатков, химически дериватизированных посредством реакции функциональной боковой группы. Также в качестве "производных" включены те пептиды, которые содержат одно или более производных аминокислот природного происхождения из двадцати стандартных аминокислот. Например, 4-гидроксипролин может замещать пролин; 5-гидроксилизин может замещать лизин; 3-метилгистидин может замещать гистидин; гомосерин может замещать серин и орнитин может замещать лизин.

Термин "полинуклеотид" включает в себя одиночную нуклеиновую кислоту, а также множественные нуклеиновые кислоты, и относится к выделенной молекуле или конструкции нуклеиновой кислоты, например матричной РНК (мРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать традиционную фосфодиэфирную связь или нетрадиционную связь (например, амидную связь, которую можно обнаружить в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" относит-

ся к какому-либо одному или более сегментам нуклеиновой кислоты, например фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде. Под "выделенными" нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была удалена из своей естественной среды. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий антитело, содержащееся в векторе, считается выделенным в контексте настоящего изобретения. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, содержащиеся в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или в значительной степени) от других полинуклеотидов в растворе. Выделенные молекулы РНК включают *in vivo* или *in vitro* РНК транскрипты полинуклеотидов согласно настоящему изобретению. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению дополнительно включают такие молекулы, полученные синтетическим путем. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота может содержать регуляторный элемент, такой как промотор, энхансер, участок связывания рибосомы или сигнал терминирования транскрипции.

Употребляемое в данном тексте выражение "кодирующая область" представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) обычно не транслируется в аминокислоту, он может считаться частью кодирующей области, но любые фланкирующие последовательности, например промоторы, участки связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны и тому подобные элементы, не являются частью кодирующей области. Две или более кодирующих областей согласно настоящему изобретению могут присутствовать в одиночной полинуклеотидной конструкции, например в одиночном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например в отдельных (разных) векторах. Более того, любой вектор может содержать одиночную кодирующую область или содержать две или более кодирующих областей, например одиночный вектор, может отдельно кодировать вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота согласно данному изобретению могут кодировать гетерологичные кодирующие области, как слитые, так и не слитые с нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающую молекулу, антитело или его фрагмент, вариант или производное. Гетерологичные кодирующие области включают, без ограничений, специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

В определенных вариантах реализации изобретения полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В случае ДНК полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, как правило, может включать промотор и/или другие транскрипционные или трансляционные контрольные элементы, функционально ассоциированные с одной или более кодирующими областями. Функциональная ассоциация возникает в случае, когда кодирующая область для генного продукта, например полипептида, ассоциирована с одной или более регуляторными областями таким образом, чтобы экспрессия генного продукта оказалась под влиянием или контролем регуляторной(ых) последовательности(ей). Два фрагмента ДНК (таких как кодирующая полипептид область и связанный с ней промотор) считаются "функционально ассоциированными" или "функционально связанными", если индукция функции промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей желаемый генный продукт, и если природа связи между двумя фрагментами ДНК не препятствует возможности экспрессионных регуляторных последовательностей управлять экспрессией генного продукта или не препятствует возможности транскрибирования ДНК-матрицы. Таким образом, промоторная область считается функционально ассоциированной с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор способен влиять на транскрипцию этой нуклеиновой кислоты. Промотор может представлять собой клеточно-специфический промотор, который фактически управляет транскрипцией ДНК только в predetermineded клетках. Другие транскрипционные контрольные элементы, кроме промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминирования транскрипции, могут быть функционально ассоциированными с полинуклеотидом для того, чтобы управлять клеточно-специфической транскрипцией. В данном документе описаны подходящие промоторы и другие транскрипционные контрольные области.

Специалистам в данной области техники известно множество транскрипционных контрольных областей. Они включают, без ограничений, транскрипционные контрольные области, которые функционируют в клетках позвоночных, такие как, без ограничений, промоторные и энхансерные сегменты цитомегаловирусов (предранний промотор в сочетании с интроном-А), вирус обезьян 40 (ранний промотор) и ретровирусы (такие как вирус саркомы Рауса). Другие транскрипционные контрольные области включают те, которые были получены из генов позвоночных, такие как актин, белок теплового шока, бычий гормон роста и кроличий β -глобин, а также другие последовательности, способные контролировать генную экспрессию в эукариотических клетках. Дополнительные подходящие транскрипционные контрольные области включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также лимфокин-индуцируемые промоторы (например, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами промоторы).

Аналогично, специалистам в данной области техники известно множество трансляционных контрольных элементов. Они включают, но не ограничиваются этим, участки связывания рибосом, кодоны инициации и терминирования трансляции и элементы, полученные из пикорнавирусов (в частности, участок внутренней посадки рибосомы или УВРП, также называемый СТЕ-последовательностью).

В других вариантах реализации изобретения полинуклеотид согласно настоящему изобретению представляет собой РНК, например в форме матричной РНК (мРНК).

Кодирующие области полинуклеотида и нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть ассоциированы с дополнительными кодирующими областями, которые кодируют секреторные или сигнальные пептиды, которые управляют секрецией полипептида, кодируемого полинуклеотидом согласно настоящему изобретению. Согласно гипотезе сигнальной последовательности, белки, секретируемые клетками млекопитающих, содержат сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, которые отщепляются от зрелого белка, как только иницируется экспорт растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Специалистам в данной области техники известно, что полипептиды, секретируемые клетками позвоночных, в общем случае содержат сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от полного или "полноразмерного" полипептида, чтобы образовать секретируемую или "зрелую" форму полипептида. В некоторых вариантах реализации изобретения применяют нативный сигнальный пептид, например сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, или функциональное производное такой последовательности, которое сохраняет способность управлять секрецией функционально ассоциированного с ней полипептида. В другом варианте можно применять гетерологичный сигнальный пептид млекопитающего или его функциональное производное. Например, лидерная последовательность дикого типа может быть замещена лидерной последовательностью человеческого тканевого активатора плазминогена (ТАП) или мышинным сигнальным пептидом β -глюкуронидазы.

Если не указано иное, термины "нарушение" и "заболевание" употребляются в данном документе взаимозаменяемо.

В контексте настоящего изобретения "связывающая молекула" относится главным образом к антителам и их фрагментам, но также может относиться к молекулам, не являющимся антителами, которые связываются с тау, включая, но не ограничиваясь этим, гормоны, рецепторы, лиганды, молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГ), шапероны, такие как белки теплового шока (БТШ), а также молекулы межклеточной адгезии, такие как представители суперсемейств кадгеринов, интегринов, лектинов С-типа и иммуноглобулинов (Ig). Таким образом, исключительно во избежание двусмысленного толкования и не ограничивая объем настоящего изобретения, большинство нижеприведенных вариантов реализации изобретения обсуждаются в отношении антител и антитело-подобных молекул, которые представляют собой отдельные варианты реализации связывающих молекул для разработки терапевтических и диагностических агентов.

Термины "антитело" и "иммуноглобулин" используются в данном документе взаимозаменяемо. Антитело или иммуноглобулин представляет собой тау-связывающую молекулу, которая содержит по меньшей мере переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи. Основные структуры иммуноглобулина позвоночных относительно хорошо известны; см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988).

Как более подробно обсуждается ниже, термин "иммуноглобулин" включает разнообразные широкие классы полипептидов, которые различаются биохимически. Специалистам в данной области техники известно, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ), в которых выделяют подклассы (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Природа такой цепи определяет принадлежность антитела к "классу" IgG, IgM, IgA IgG или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д., являются хорошо изученными и, как известно, определяют функциональную специализацию. Специалисту в данной области техники будет нетрудно различить модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов, принимая во внимание данное изобретение, и, соответственно, они входят в объем изобретения. Понятно, что все классы иммуноглобулинов входят в объем настоящего изобретения, а нижеприведенное обсуждение в целом относится к IgG классу молекул иммуноглобулина. В случае IgG стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой, составляющей приблизительно 23000 Дальтон, и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой, составляющей 53000-70000. Как правило, четыре цепи соединены дисульфидными связями в "Y" конфигурацию, при этом легкие цепи берут тяжелые цепи в "вилку", начиная с устья "Y" и на протяжении всей переменной области.

Легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда (κ , λ). Тяжелая цепь каждого класса может быть связана с каппа или лямбда легкой цепью. Обычно легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом посредством ковалентных дисульфидных связей или нековалентных связей в случае, когда иммуноглобулины вырабатываются гибридомами, В-клетками или генетически сконструированными клетками-хозяевами. Аминокислотные последовательности в тяжелой цепи идут от N-конца в разветвленных концах Y-конфигурации к C-концу внизу каждой цепи.

Обе цепи - легкая и тяжелая - разделены на области, характеризующиеся структурной и функциональной гомологией. Термины "константный" и "переменный" используются функционально. В связи с этим следует принимать во внимание, что переменные домены частей легкой (V_L) и тяжелой (V_H) це-

пей определяют способность распознавать антиген и специфичность. И наоборот, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) обеспечивают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и тому подобные. Условно считается, что нумерация доменов константных областей возрастает с удалением от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. N-Терминальная часть представляет собой переменную область, а в C-терминальной части находится константная область; домены CH3 и CL фактически содержат карбоксиконец тяжелой и легкой цепи соответственно.

Как указано выше, переменная область позволяет антителу избирательно распознавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. Это означает, что V_L -домен и V_H -домен или подгруппа определяющих комплементарность областей (CDR) антитела вместе образуют переменную область, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, находящийся в конце каждого плеча Y. Точнее, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR на каждой из V_H и V_L цепей. Любой фрагмент антитела или иммуноглобулина, который имеет структуру, достаточную для того, чтобы специфически связываться с тау, взаимозаменяемо называется в данном документе "связывающим фрагментом" или "иммуноспецифическим фрагментом".

В антителах природного происхождения антитело содержит шесть гиперпеременных областей, иногда называемых "определяющими комплементарность областями", или "CDR", присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, которые представляют собой короткие, несмежные последовательности аминокислот, которые расположены определенным образом, чтобы образовывать антигенсвязывающий домен, когда антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. "CDR" фланкируются четырьмя относительно консервативными "каркасными" областями, или "FR", которые проявляют меньшую межмолекулярную переменность. Каркасные области в большинстве случаев принимают β -складчатую конформацию, а CDR образуют петли, которые соединяют и, в некоторых случаях, формируют часть β -складчатой структуры. Таким образом, функцией каркасных областей является формирование каркаса, который обеспечивает расположение CDR в правильной ориентации посредством межцепевых нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный расположенными определенным образом CDR, определяет комплементарность поверхности к эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность стимулирует нековалентное связывание антитела со своим когнатным эпитопом. Специалисту в данной области техники будет нетрудно определить аминокислоты, входящие, соответственно, в состав CDR и каркасных областей, в случае любой заданной переменной области тяжелой или легкой цепи, так как они были точно определены; см. "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. В случае если для употребляемого и/или принятого в данной области техники термина существует два или более определений, определение употребляемого в данном документе термина включает в себя все такие значения, если четко не указано иное. В качестве конкретного примера можно привести употребление термина "определяющая комплементарность область" ("CDR") для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов, находящихся в пределах переменной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эта конкретная область была описана в Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) и в Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, которые включены в данный документ посредством ссылки и в которых определения включают перекрытие подгрупп аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Несмотря на это, считается, что применение любого определения в отношении CDR антитела или его вариантов входит в объем определенного и употребляемого в данном документе термина. Соответствующие аминокислотные остатки, которые входят в состав CDR согласно определению любой из вышеперечисленных ссылок, приведены ниже в табл. 1 в качестве сравнения. Точные номера остатков, которые входят в состав конкретной CDR, будут варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники легко могут определить, какие остатки образуют конкретную гиперпеременную область или CDR человеческого антитела подтипа IgG, если задана аминокислотная последовательность переменной области антитела.

Таблица 1

Определения CDR ¹		
	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

Нумерация во всех определениях CDR в табл. 1 приведена в соответствии с правилами нумерации, введенными Kabat et al. (см. ниже).

В Kabat et al., также была определена система нумерации для последовательностей переменных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно отнести систему "нумерации по Кабату" к любой последовательности переменного домена, не опираясь на какие-либо экспериментальные данные, за исключением самой последовательности. Употребляемое в данном документе выражение "нумерация по Кабату" относится к системе нумерации, введенной Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Если не оговорено иное, ссылки на нумерацию отдельных позиций аминокислотных остатков в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, варианте или производном согласно настоящему изобретению приводятся в соответствии с системой нумерации Кабата, которая, однако, является теоретической и может не подходить в равной степени к любому антителу согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации изобретения в зависимости от позиции первой CDR следующие CDR могут быть смещены в любом направлении.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифические фрагменты, варианты или производные согласно данному изобретению включают, но не ограничиваются этим, поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные, муринизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fvs, одноцепочечные Fvs (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fvs (sdFv), фрагменты, содержащие домен V_L или V_H, фрагменты, полученные из экспрессионной библиотеки Fab, и анти-идиотипические (анти-Ид) антитела (включая, например, анти-Ид антитела, описанные в данном документе). Молекулы ScFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 5892019. Молекулы иммуноглобулинов или антител согласно данному изобретению могут принадлежать любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул. В одном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению не представляет собой IgM или его производное с пентавалентной структурой. В частности, в отдельных применениях настоящего изобретения, в особенности при терапевтическом использовании, IgM являются менее эффективными, чем IgG и другие двухвалентные антитела или соответствующие связывающие молекулы, так как из-за своей пентавалентной структуры и отсутствия созревания аффинности IgM часто проявляют неспецифическую перекрестную реактивность и очень низкую аффинность.

В конкретном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению не представляет собой поликлональное антитело, т.е. состоит преимущественно из одного конкретного вида антител, а не представляет собой смесь, полученную из плазменного образца иммуноглобулина.

Фрагменты антител, включая одноцепочечные антитела, могут содержать переменную(ые) область(и) саму по себе или в комбинации со всеми или частью следующих элементов: шарнирной областью, доменами CH1, CH2 и CH3. Также в изобретение включены антигенсвязывающие фрагменты, содержащие любую комбинацию переменной(ых) области(ей) с шарнирной областью, доменами CH1, CH2 и CH3. Антитела или их иммуноспецифические фрагменты согласно настоящему изобретению могут быть получены из любого животного источника, включая птиц и млекопитающих. В одном варианте реализации изобретения антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или цыпленка. В другом варианте реализации изобретения переменная область может иметь акулье происхождение (например, быть полученной от акул).

В одном аспекте антитело согласно данному изобретению представляет собой человеческое моноклональное антитело, выделенное из человека. Необязательно, каркасная область человеческого антитела выровнена и выбрана в соответствии с последовательностями переменной области подходящей человеческой зародышевой линии из базы данных; см., например, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), находящуюся на хостинге MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK). Например, считается, что аминокислоты могут сильно отличаться от реальной последовательности зародышевой линии из-за последовательностей ПЦР-праймеров, встроенных во время процесса клонирования. По сравнению с искусственно полученными человекоподобными антителами, такими как одноцепочечные фрагменты антител (scFvs) из полученной методом фагового дисплея библиотеки антител или ксеногенных мышей, человеческое моноклональное антитело согласно настоящему изобретению характеризуется тем, что (i) было получено при помощи человеческого иммунного ответа, а не животных суррогатов, т.е. антитело было сгенерировано в ответ на природный тау в своей характерной конформации в организме человека, (ii) защищает индивида или является по меньшей мере существенным для наличия тау, и (iii) так как антитело имеет человеческое происхождение, риск перекрестной реактивности против собственных антигенов минимизирован. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением термины "человеческое моноклональное антитело", "человеческое моноклональное аутоантитело", "человеческое антитело" и им подобные используются для обозначения тау-связывающей молекулы, которая имеет человеческое происхождение, т.е. была выделена из человеческой клетки, такой как В-клетка, или ее гибридомы, или кДНК которой была непосредственно клонирована с мРНК человеческой клетки, например человеческой В-клетки памяти. Человеческое антитело является "человеческим", даже если в антителе были проведены аминокислотные замены, например, для улучшения характеристик связывания.

Антитела, полученные из библиотек человеческого иммуноглобулина или от животных, трансгенных в отношении одного или более человеческих иммуноглобулинов, которые не экспрессируют эндогенных иммуноглобулинов, как описано выше и, например, в патенте США № 5939598 авторства Kuchelapati et al., называются человекоподобными антителами, чтобы отличать их от действительно человеческих антител согласно настоящему изобретению.

Например, усечение тяжелой и легкой цепей человекоподобных антител, таких как синтетические или полусинтетические антитела, выделенные, как правило, из фагового дисплея, не обязательно отображают действительное усечение, которое происходит в настоящей человеческой В-клетке. Соответственно, фрагменты Fab и scFv, полученные из рекомбинантных экспрессионных библиотек, которые обычно применяли в известном уровне техники, могут считаться искусственными со всеми вытекающими последствиями в отношении иммуногенности и стабильности.

В настоящем изобретении, напротив, предлагаются выделенные антитела с созревшей аффинностью, полученные от выбранных человеческих субъектов, которые характеризуются своей терапевтической пользой и переносимостью в организме людей.

Употребляемый в данном документе термин "муринизированное антитело" или "муринизированный иммуноглобулин" относится к антителу, содержащему одну или более CDR из человеческого антитела согласно настоящему изобретению; и человеческую каркасную область, которая содержит аминокислотные замены и/или делеции и/или вставки на основе последовательности мышинного антитела. Человеческий иммуноглобулин, являющийся источником CDR, называется "родительским" или "акцептором", а мышинное антитело, являющееся источником изменений в каркасной области, называется "донором". Наличие константных областей не обязательно, но если они есть, они обычно в значительной степени идентичны константным областям мышинного антитела, т.е. идентичны по меньшей мере на около 85-90, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99% или более. Следовательно, в некоторых вариантах реализации изобретения полноразмерный муринизированный человеческий содержащий тяжелую или легкую цепь иммуноглобулин содержит мышиную константную область, человеческие CDR и в значительной степени человеческую каркасную область, которая содержит некоторое количество "муринизирующих" аминокислотных замен. Как правило, "муринизированное антитело" представляет собой антитело, содержащее муринизированную переменную легкую цепь и/или муринизированную переменную тяжелую цепь. Например, в понятие муринизированного антитела не входит типичное химерное антитело, например, из-за того, что вся переменная область химерного антитела является не мышинной. Модифицированное антитело, которое было "муринизировано" в процессе "муринизации", связывается с тем же самым антигеном, что и родительское антитело, которое служит источником CDR, и обычно является менее иммуногенным для мыши, чем родительское антитело.

Употребляемый в данном документе термин "часть тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий часть тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один элемент из СН1-домена, шарнирного (например, верхнего, среднего и/или нижнего шарнирного участка) домена, СН2-домена, СН3-домена или их варианта или фрагмента. Например, связывающий полипептид для применения в данном изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую СН1-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, по меньшей мере часть шарнирного домена и СН2-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен и СН3-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, по меньшей мере часть шарнирного домена и СН3-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, по меньшей мере часть шарнирного домена, СН2-домен и СН3-домен. В другом варианте реализации изобретения полипептид согласно данному изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую СН3-домен. Кроме того, в связывающем полипептиде для применения в данном изобретении может отсутствовать по меньшей мере часть СН2-домена (например, весь или часть СН2-домена). Как было указано выше, специалисту в данной области техники понятно, что эти домены (например, части тяжелой цепи) можно модифицировать таким образом, чтобы они отличались по аминокислотной последовательности от молекулы иммуноглобулина природного происхождения.

В определенных антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных, описанных в данном документе, части тяжелой цепи одной полипептидной цепи мультимера идентичны тем, что находятся на второй полипептидной цепи мультимера. В альтернативном варианте мономеры согласно данному изобретению, содержащие части тяжелой цепи, не являются идентичными. Например, каждый мономер может содержать сайт связывания разных мишеней, образуя, например, биспецифичное антитело или диатело.

В другом варианте реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, описанные в данном документе, состоят из одиночной полипептидной цепи, такой как scFvs, и предназначены для внутриклеточной экспрессии (интратела) для потенциальных *in vivo* терапевтических и диагностических применений.

Части тяжелой цепи связывающего полипептида для применения в раскрытых в данном документе способах диагностирования и лечения можно получить из разных молекул иммуноглобулина. Например, часть тяжелой цепи полипептида может содержать СН1-домен, полученный из молекулы IgG1, и шар-

нирную область, полученную из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать шарнирную область, частично полученную из молекулы IgG1, и частично - из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать химерную шарнирную область, частично полученную из молекулы IgG1, и частично - из молекулы IgG4.

Употребляемый в данном документе термин "часть легкой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из легкой цепи иммуноглобулина. В одном варианте реализации изобретения часть легкой цепи содержит по меньшей мере один элемент из V_L - или CL -домена.

Считается, что минимальный размер пептидного или полипептидного эпитопа для антитела составляет от около четырех до пяти аминокислот. Пептидные или полипептидные эпитопы могут содержать по меньшей мере семь, по меньшей мере девять или по меньшей мере от около 15 до около 30 аминокислот. Так как CDR может распознавать антигенный пептид или полипептид в четвертичной форме, аминокислоты, входящие в состав эпитопа, не должны быть смежными и, в некоторых случаях, могут даже не находиться на одной пептидной цепи. В настоящем изобретении пептидный или полипептидный эпитоп, распознаваемый антителами согласно настоящему изобретению, содержит последовательность из по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, либо от около 5 до около 30, от около 10 до около 30 или от около 15 до около 30 смежных или несмежных аминокислот тау.

Под выражениями "специфически связывается" или "специфически распознает", используемыми взаимозаменяемо в данном документе, в целом подразумевается то, что связывающая молекула, например антитело, связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена и что связывание предусматривает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. В соответствии с этим определением говорят, что антитело "специфически связывается" с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена с большей вероятностью, чем в случае произвольного неродственного эпитопа. Специалисту в данной области техники понятно, что антитело может специфически связываться или специфически распознавать выделенный полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотных остатков, соответствующих линейной части прерывистого эпитопа. Термин "специфичность" используется в данном документе для определения относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, антитело "А" предположительно может иметь более высокую специфичность в отношении заданного эпитопа, чем антитело "В", или можно говорить, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем в случае родственного эпитопа "D".

Употребляемый термин "иммунологические характеристики связывания" или другие характеристики связывания антитела с антигеном во всех своих грамматических формах относится к специфичности, аффинности, перекрестной реактивности и другим характеристикам связывания антитела.

Под "предпочтительно связывается" подразумевается то, что связывающая молекула, например антитело, специфически связывается с эпитопом с большей вероятностью, чем оно связывалось бы с родственным, сходным, гомологичным или аналогичным эпитопом. Таким образом, антитело, которое "предпочтительно связывается" с данным эпитопом, с большей вероятностью будет связываться с этим эпитопом, чем с родственным эпитопом, даже если такое антитело может перекрестно реагировать с родственным эпитопом.

В качестве неограничивающего примера может считаться, что связывающая молекула, например антитело, предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает указанный первый эпитоп с константой диссоциации (K_d) меньшей, чем K_d антитела в отношении второго эпитопа. В другом неограничивающем примере может считаться, что антитело предпочтительно связывает первый антиген, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью по меньшей мере на один порядок меньшей, чем K_d антитела в отношении второго эпитопа. В другом неограничивающем примере может считаться, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью по меньшей мере на два порядка меньшей, чем K_d антитела в отношении второго эпитопа.

В другом неограничивающем примере может считаться, что связывающая молекула, например антитело, предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп со скоростью диссоциации ($k(\text{дисс})$), меньшей, чем $k(\text{дисс})$ антитела в отношении второго эпитопа. В другом неограничивающем примере может считаться, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью по меньшей мере на один порядок меньшей, чем $k(\text{дисс})$ антитела в отношении второго эпитопа. В другом неограничивающем примере может считаться, что антитело предпочтительно связывает первый эпитоп, если оно связывает первый эпитоп с аффинностью по меньшей мере на два порядка меньшей, чем $k(\text{дисс})$ антитела в отношении второго эпитопа.

Говорят, что раскрытая в данном документе связывающая молекула, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, связывает тау или его фрагмент или вариант со скоростью диссоциации ($k(\text{дисс})$), меньшей или равной $5 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$, 10^{-2} с^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или 10^{-3} с^{-1} . В одном варианте реализации изобретения говорят, что антитело согласно изобретению связывает тау или его

фрагмент или вариант со скоростью диссоциации ($k(\text{дисс})$), меньшей или равной $5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, 10^{-4} с^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или 10^{-5} с^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$, 10^{-6} с^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$ или 10^{-7} с^{-1} .

Говорят, что раскрытая в данном документе связывающая молекула, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, связывает тау или его фрагмент или вариант со скоростью ассоциации ($k(\text{асс})$), большей или равной $10^3 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, $10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ или $5 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. В одном варианте реализации изобретения говорят, что антитело согласно изобретению связывает тау или его фрагмент или вариант со скоростью ассоциации ($k(\text{асс})$) большей или равной $10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, $10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, $5 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ или $10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

Говорят, что связывающая молекула, например антитело, конкурентно ингибирует связывание стандартного антитела с данным эпитопом, если оно предпочтительно связывается с этим эпитопом в такой мере, что оно блокирует в некоторой степени связывание стандартного антитела с этим эпитопом. Конкурентное ингибирование можно определить любым известным в данной области техники методом, например методом конкурентного анализа ELISA. Говорят, что антитело конкурентно ингибирует связывание стандартного антитела с данным эпитопом по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 60 или по меньшей мере на 50%. Специалисту в данной области техники понятно, что связывание антитела со своим эпитопом также может конкурентно ингибироваться связывающей молекулой, которая не является антителом. Например, специфическое связывание описанного в данном документе антитела к тау, например hTau40, может конкурентно ингибироваться микротрубочками.

Употребляемый в данном документе термин "аффинность" относится к определению силы связывания отдельного эпитопа с CDR связывающей молекулы, например молекулы иммуноглобулина; см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988), с. 27-28. Употребляемый в данном документе термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между популяцией иммуноглобулинов и антигеном, то есть функциональной силе связывания смеси иммуноглобулинов с антигеном; см., например, Harlow, с. 29-34. Авидность связана как с аффинностью отдельных молекул иммуноглобулина в популяции со специфичными эпитопами, так и с валентностями иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между двухвалентным моноклональным антителом и антигеном с высокоповторяющейся структурой эпитопов, таким как полимер, может характеризоваться высокой авидностью. Аффинность или авидность антитела в отношении антигена можно определить экспериментально любым подходящим способом; см., например, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In *Fundamental Immunology*, Paul, W.E., Ed., Raven Press New York, NY (1984), Kuby, Janis *Immunology*, W.H. Freeman and Company New York, NY (1992) и описанные в этих работах методы. Общепринятые методы определения аффинности антитела в отношении антигена включают ELISA, RIA и поверхностный плазмонный резонанс. Измеренная аффинность конкретного взаимодействия антитело-антиген может варьироваться при проведении измерений в разных условиях, например при разной солевой концентрации, pH. Таким образом, определение аффинности и других антигенсвязывающих параметров, например K_d , IC_{50} , предпочтительно проводить, используя стандартизированные растворы антитела и антигена и стандартизированный буфер.

Связывающие молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению, также можно описать или привести в терминах их перекрестной реактивности. Употребляемый в данном документе термин "перекрестная реактивность" относится к способности антитела, специфичного в отношении одного антигена, реагировать со вторым антигеном; и является мерой родства между двумя разными антигенными веществами. Таким образом, антитело является перекрестно реагирующим, если оно связывается с эпитопом, отличным от того, который индуцировал его образование. Перекрестно-реагирующий эпитоп обычно содержит много одинаковых с индуцирующим эпитопом структурных элементов и, в некоторых случаях, фактически может быть более подходящим, чем оригинальный.

Например, определенные антитела характеризуются некоторой степенью перекрестной реактивности в том смысле, что они связывают родственные, но неидентичные эпитопы, например эпитопы, имеющие по меньшей мере 95, по меньшей мере 90, по меньшей мере 85, по меньшей мере 80, по меньшей мере 75, по меньшей мере 70, по меньшей мере 65, по меньшей мере 60, по меньшей мере 55 и по меньшей мере 50% идентичности (согласно расчету по известным в данной области техники и описанным в данном документе методам) со стандартным эпитопом. Говорят, что антитело обладает слабой или вообще не обладает перекрестной реактивностью, если оно не связывает эпитопы, имеющие менее 95, менее 90, менее 85, менее 80, менее 75, менее 70, менее 65, менее 60, менее 55 и менее 50% идентичности (согласно расчету по известным в данной области техники и описанным в данном документе методам) со стандартным эпитопом. Предполагается, что антитело является "высокоспецифичным" по отношению к определенному эпитопу, если оно не связывает любой другой аналог, ортолог или гомолог этого эпитопа.

Связывающие молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, также можно описать или привести в терминах аффинности их связывания с тау. В

одном варианте реализации изобретения аффинности связывания соответствуют величинам с константой диссоциации, или K_d , меньшей чем 5×10^{-2} М, 10^{-2} М, 5×10^{-3} М, 10^{-3} М, 5×10^{-4} М, 10^{-4} М, 5×10^{-5} М, 10^{-5} М, 5×10^{-6} М, 10^{-6} М, 5×10^{-7} М, 10^{-7} М, 5×10^{-8} М, 10^{-8} М, 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М, 10^{-12} М, 5×10^{-13} М, 10^{-13} М, 5×10^{-14} М, 10^{-14} М, 5×10^{-15} М или 10^{-15} М.

Как было указано ранее, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей разных классов иммуноглобулинов хорошо известны. Употребляемый в данном документе термин "V_H-домен" включает аминокислотный терминальный вариационный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин "СН1-домен" включает первый (самый аминокислотный терминальный) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. СН1-домен прилегает к V_H-домену и является аминокислотным терминальным по отношению к шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

Употребляемый в данном документе термин "СН2-домен" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, приблизительно от остатка 244 до остатка 360 антитела согласно общепринятым схемам нумерации (остатки от 244 до 360 согласно системе нумерации Кабата и остатки 231-340 согласно Европейской системе нумерации; см. Kabat E.A. et al., op. Cit). СН2-домен является уникальным в том, что он не является близко спаренным с другим доменом. Точнее, между двумя СН2-доменами интактной нативной молекулы IgG находятся две N-связанные разветвленные углеводные цепи. Также хорошо известно, что СН3-домен простирается от СН2-домена до С-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

Употребляемый в данном документе термин "шарнирная область" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет СН1-домен с СН2-доменом. Шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что дает возможность двум N-терминальным антигенсвязывающим областям двигаться независимо. Шарнирные области можно разделить на три основных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены; см. Roux et al., J. Immunol. 161 (1998), 4083.

Употребляемый в данном документе термин "дисульфидная связь" означает ковалентную связь, образуемую между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или дисульфидный мостик со второй тиольной группой. В большинстве молекул IgG природного происхождения области СН1 и СL соединены дисульфидной связью, а две тяжелые цепи соединены двумя дисульфидными связями в позициях, соответствующих 239 и 242 согласно системе нумерации Кабата (позиция 226 или 229 согласно Европейской системе нумерации).

Употребляемые в данном документе термины "связанный", "слитый" или "слияние" используются взаимозаменяемо. Эти термины относятся к соединению вместе двух или более элементов или компонентов любым путем, включая химическую конъюгацию или рекомбинантные способы. "Слияние в рамке" относится к соединению двух или более полинуклеотидных открытых рамок считывания (ОРС) с образованием непрерывной более длинной ОРС таким образом, что сохраняется правильная трансляционная рамка считывания оригинальных ОРС. Таким образом, рекомбинантный слитый белок представляет собой одиночный белок, содержащий два или более сегментов, которые соответствуют полипептидам, кодируемым оригинальными ОРС (сегменты которых в природе обычно настолько не соединены). Хотя рамка считывания, таким образом, становится непрерывной на протяжении слитых сегментов, сегменты могут быть физически или пространственно разделены посредством, например, линкерной последовательности, находящейся внутри рамки. Например, полинуклеотиды, кодирующие CDR вариационной области иммуноглобулина, могут быть слиты в рамке, но при этом разделены полинуклеотидом, кодирующим по меньшей мере одну каркасную область иммуноглобулина или дополнительные CDR-области, так как "слитые" CDR транслируются вместе как часть непрерывного полипептида.

Употребляемый в данном документе термин "экспрессия" относится к процессу, посредством которого ген продуцирует биохимическое соединение, например РНК или полипептид. Данный процесс включает любое проявление функционального наличия в клетке гена, включая, без ограничений, генный нокаут, а также временную экспрессию и стабильную экспрессию. Он включает без ограничений транскрипцию гена в матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), малую шпильчатую РНК (мшРНК), малую интерферирующую РНК (миРНК) или любой другой РНК-продукт, и трансляцию мРНК в полипептид(ы). Если конечный желаемый продукт представляет собой биохимическое соединение, экспрессия включает образование этого биохимического соединения и любых его предшественников. Экспрессия гена продуцирует "генный продукт". В данном контексте генный продукт может представлять собой нуклеиновую кислоту, например матричную РНК, полученную посредством транскрипции гена, или полипептид, который был транслирован с транскрипта. Описанные в данном документе генные продукты дополнительно включают нуклеиновые кислоты, прошедшие пост-транскрипционные модификации, например полиаденилирование, или полипептиды, прошедшие пост-трансляционные модификации, например метилирование, гликозилирование, добавление липидов, объединение с другими белковыми субъединицами, протеолитическое расщепление и тому подобное.

Употребляемый в данном документе термин "образец" относится к любому биологическому материалу, полученному от субъекта или пациента. В одном аспекте образец может содержать кровь, цереброспинальную жидкость ("ЦСЖ") или мочу. В других аспектах образец может содержать цельную кровь,

плазму крови, В-клетки, обогащенные из образцов крови, и культивированные клетки (например, В-клетки, полученные от субъекта). Также образец может содержать образец биопсии или ткани, включая нервную ткань. В других аспектах образец может содержать цельные клетки и/или лизаты клеток. Образцы крови можно получать при помощи известных в данной области техники методов. В одном аспекте осадок можно перерастворять путем интенсивного перемешивания при 4°C в 200 мкл буфера (20 mM Трис, pH. 7,5, 0,5% Nonidet, 1 mM ЭДТУ, 1 mM ФМСФ, 0,1 M NaCl, ингибитор протеаз IX Sigma и IX ингибиторы фосфатаз Sigma 1 и 2). Суспензию можно выдерживать на льду на протяжении 20 мин, периодически перемешивая. После центрифугирования при 15000×g на протяжении 5 мин при около 4°C аликвоты супернатанта можно хранить при около -70°C.

Употребляемые в данном документе термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупреждающим мерам, когда целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, такого как развитие паркинсонизма. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, отложение или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение состояния заболевания и ремиссию (как частичную, так и полную), как выявляемые, так и не выявляемые. Также "лечение" может обозначать продление времени жизни по сравнению с прогнозируемым временем жизни без лечения. Нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже проявляется патологическое состояние или нарушение, а также тех, кто предрасположен к появлению патологического состояния или нарушения, или тех, у кого необходимо предотвратить проявления патологического состояния или нарушения.

Под "субъектом" или "индивидом", или "животным", или "пациентом", или "млекопитающим" подразумевается любой субъект, в частности субъект, относящийся к млекопитающим, например являющийся человеком пациент, для которого необходимо проведение диагностирования, прогнозирования или лечения.

II. Антитела.

Настоящее изобретение в целом относится к человеческим анти-тау антителам и их антигенсвязывающим фрагментам. В одном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению демонстрирует иммунологические связывающие характеристики и/или биологические свойства, приведенные для антител, проиллюстрированных в примерах. В соответствии с настоящим изобретением человеческие моноклональные антитела, специфические в отношении тау, были клонированы из пула здоровых человеческих субъектов.

В ходе экспериментов, проводимых в соответствии с настоящим изобретением, первые попытки клонировать тау-специфические антитела были неудачными и практически всегда приводили к получению ложноположительных клонов. Чтобы обойти эту проблему, антитела в кондиционированной среде культур человеческих В-клеток памяти параллельно исследовали в отношении связывания с рекомбинантным белком тау, PHFTau, выделенным из пораженного БА мозга, экстрактами из здорового контрольного мозга и бычьим сывороточным альбумином (БСА). Клонированию антител подвергали только те культуры В-клеток, которые оказались положительными в отношении рекомбинантного тау и/или PHFTau, но не в отношении контрольного экстракта из мозга или БСА.

Первые попытки выделения специфических антител были сфокусированы на пулах здоровых человеческих субъектов с высокой плазменной связывающей активностью в отношении тау, предполагая наличие повышенных уровней циркулирующих антител к тау в плазме крови. Неожиданно эти попытки оказались неудачными в отношении получения тау-специфических человеческих В-клеток памяти, а антитела, описанные в настоящем изобретении, были выделены из пулов здоровых человеческих субъектов, которые не были предварительно выбраны из-за высокой плазменной реактивности тау или имели низкую плазменную реактивность в отношении тау.

Согласно этому критерию можно было выделить несколько антител. Выбранные антитела дополнительно анализировали для определения класса и подкласса легкой цепи. Соответствующие транскрипты антител, выбранные из культур В-клеток памяти, затем транскрибировали при помощи ОТ-ПЦР, клонировали и вносили в экспрессионный вектор для рекомбинантного получения; см. приложенные Примеры. Рекомбинантная экспрессия человеческих антител в клетках НЕК293 или СНО и последующая характеристика их связывающей специфичности в отношении полноразмерного тау, его патологически модифицированных форм методом вестерн-блоттинга и их отличительное связывание с патологически агрегированным тау подтвердили тот факт, что впервые были клонированы высокоспецифичные в отношении тау человеческие антитела, отличительной чертой которых является распознавание патологически модифицированных форм белка тау.

Таким образом, настоящее изобретение в целом относится к выделенному человеческому моноклональному анти-тау антителу природного происхождения и его связывающим фрагментам, производным и вариантам. В одном варианте реализации изобретения антитело способно специфически связывать полноразмерный рекомбинантный тау и/или патологически агрегированную и/или фосфорилированную форму (PHFTau), выделенную из пораженного БА мозга в денатурирующих условиях методом вестерн-

блоттинга.

В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к анти-тау антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производному, при этом антитело специфически связывается с тем же самым эпитопом тау, что и стандартное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6 или NI-105.9C4.

Дополнительные человеческие анти-тау антитела раскрыты в заявке на патент США № 2012/0087861, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело специфически связывается с эпитопом тау, содержащим аминокислотные остатки, выбранные из группы, состоящей из: остатков, соответствующих остаткам 125-131, 397-441, 226-244, 217-227, 37-55, 387-406, 421-427, 427-439, 1-158, 197-207, 57-67, 355-441, 313-319, 309-319 и 221-231 hTau40 (SEQ ID NO: 6). В дополнительном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело специфически связывается с эпитопом тау, содержащим аминокислотные остатки, соответствующие остаткам 37-55 и 387-406 hTau40 (SEQ ID NO: 6). В конкретном варианте реализации изобретения тау представляет собой hTau40 (SEQ ID NO: 6).

В одном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело связывается с эпитопом тау, содержащим домен связывания микротрубочек тау. В конкретном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело связывается с эпитопом тау, содержащим аминокислотные остатки из R4-области тау, как показано на фиг. 4. В одном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело конкурирует с микротрубочками за специфическое связывание тау. В другом варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело имеет сниженную аффинность связывания с ассоциированным с микротрубочками тау по сравнению с аффинностью связывания антител с тау, не ассоциированным с микротрубочками. В дополнительном варианте реализации изобретения описанное в данном документе антитело не связывается или практически не связывается с ассоциированным с микротрубочками тау. В конкретных вариантах реализации изобретения белок тау может представлять собой нативный белок тау или рекомбинантный белок тау. В конкретном варианте реализации изобретения тау представляет собой hTau40.

В одном варианте реализации изобретения человеческое анти-тау антитело согласно настоящему изобретению может специфически связывать патологически агрегированный тау и практически не связывать тау в физиологической форме в тканях мозга. Кроме того, человеческое анти-тау антитело согласно настоящему изобретению дополнительно может характеризоваться способностью распознавать тау на стадии, предвещающей образование клубков, в нейрофибриллярных клубках (НФК), нейропильных нитях и/или дистрофических нейритах в головном мозге. Следовательно, в настоящем изобретении предложены группы человеческих антител к тау со специфичностью связывания, которые, таким образом, являются исключительно полезными для применения в диагностических и терапевтических целях.

В дополнительном или альтернативном варианте анти-тау антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно распознает патологически агрегированный тау, а не физиологические его формы, в частности, при проведении анализа согласно примерам 4 и 18. В дополнительном или альтернативном варианте анти-тау антитело согласно настоящему изобретению связывается с вызывающими заболевание мутантными формами человеческого тау, в частности теми, которые описаны в примере 4. В данном контексте специфичность связывания может соответствовать диапазону с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC_{50}), составляющей от около 100 пМ до 100 нМ, или EC_{50} , составляющей от около 100 пМ до 10 нМ для тау дикого типа.

Следовательно, анти-тау антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно связывается с патологически модифицированными формами тау в головном мозге, например патологическими агрегатами тау, как проиллюстрировано методом гистохимического окрашивания, описанным в примерах 4 и 18. В другом варианте реализации изобретения анти-тау антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно связывается как с рекомбинантным тау, так и с патологически модифицированными формами тау, как проиллюстрировано в примере 2 при помощи вестерн-блоттинга.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, при этом антитело содержит антигенсвязывающий домен, идентичный домену антитела, выбранного из группы, состоящей из NI-105.17C1, NI-105.17C1(N31Q), NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6 и NI-105.9C4.

В настоящем изобретении дополнительно проиллюстрировано несколько таких связывающих молекул, например антител и их связывающих фрагментов, которые могут характеризоваться содержанием в вариабельной области, например в связывающем домене, по меньшей мере одной определяющей комплементарности области (CDR) вариабельной области V_H и/или V_L , содержащей одну из аминокислотных последовательностей, приведенных на фиг. 7. Соответствующие нуклеотидные последовательности, кодирующие вышеопределенные вариабельные области, приведены ниже в табл. 4. Типовая группа CDR вышеупомянутых аминокислотных последовательностей V_H - и/или V_L - области приведена на фиг. 7. При

этом, как обсуждается ниже, специалисту в данной области техники известно, что можно использовать дополнительные или альтернативные CDR, которые отличаются по аминокислотной последовательности от приведенных на фиг. 7 на одну, две, три или даже больше аминокислот в случае CDR2 и CDR3.

Таблица 2

Аминокислотные последовательности V_H-области, V_H CDR1, V_H CDR2, V_H CDR2, V_L-области, V_L CDR2, V_L CDR2 и V_L CDR3 тау-специфических антител

Антитело		V _H /V _L	CDR1	CDR2	CDR3
NI-105.17C1	V _H	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81
	V _L	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:82	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:84
NI-105.6C5	V _H	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:87
	V _L	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:90
NI-105.29G10	V _H	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:92	SEQ ID NO:93
	V _L	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:94	SEQ ID NO:95	SEQ ID NO:96
NI-105.6L9	V _H	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:97	SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:99
	V _L	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:100	SEQ ID NO:101	SEQ ID NO:102
NI-105.40E8	V _H	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:103	SEQ ID NO:104	SEQ ID NO:105
	V _L	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:106	SEQ ID NO:107	SEQ ID NO:108
NI-105.48E5	V _H	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:109	SEQ ID NO:110	SEQ ID NO:111
	V _L	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:112	SEQ ID NO:113	SEQ ID NO:114
NI-105.6E3	V _H	SEQ ID NO:58	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID NO:117

			NO:115	NO:116	
	V _L	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:118	SEQ ID NO:119	SEQ ID NO:120
NI-105.22E1	V _H	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:121	SEQ ID NO:122	SEQ ID NO:123
	V _L	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:124	SEQ ID NO:125	SEQ ID NO:126
NI-105.26B12	V _H	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:127	SEQ ID NO:128	SEQ ID NO:129
	V _L	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:130	SEQ ID NO:131	SEQ ID NO:132
NI-105.12E12	V _H	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:133	SEQ ID NO:134	SEQ ID NO:135
	V _L	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:136	SEQ ID NO:137	SEQ ID NO:138
NI-105.60E7	V _H	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:139	SEQ ID NO:140	SEQ ID NO:141
	V _L	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:142	SEQ ID NO:143	SEQ ID NO:144
NI-105.14E2	V _H	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:146	SEQ ID NO:147
	V _L	SEQ ID NO:70	SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:149	SEQ ID NO:150
NI-105.39E2	V _H	SEQ ID NO:71	SEQ ID NO:151	SEQ ID NO:152	SEQ ID NO:153
	V _L	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:154	SEQ ID NO:155	SEQ ID NO:156
NI-105.19C6	V _H	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:157	SEQ ID NO:158	SEQ ID NO:159
	V _L	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:161	SEQ ID NO:162
NI-105.9C4	V _H	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:163	SEQ ID NO:164	SEQ ID NO:165
	V _L	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:166	SEQ ID NO:167	SEQ ID NO:168
NI-105.17C1 (N31Q)	V _H	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81
	V _L	SEQ ID NO:221	SEQ ID NO:224	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:84

В одном варианте реализации изобретения антители согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 79-168 и 224.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно настоящему изобретению содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR, содержащих или состоящих из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 79-168 и 224.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно настоящему изобретению содержит V_H CDR1, V_H CDR2, V_H CDR3, V_L CDR1, V_L CDR2 и V_L CDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79-84, 85-90, 91-96, 97-102, 103-108, 109-114, 115-120, 121-126, 127-132, 133-138, 139-144, 145-150, 151-156, 157-162 или 163-168. В одном варианте реализации изобретения антители согласно настоящему изобретению содержит V_H CDR1, V_H CDR2, V_H CDR3, V_L CDR1, V_L CDR2 и V_L CDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79, 80, 81, 224, 83 и 84.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению содержит одну, две или три V_H CDR, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 79-81, 85-87, 91-93, 97-99, 103-105, 109-111, 115-117, 121-123, 127-129, 133-135, 139-141, 145-147, 151-153, 157-159 и 163-165.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению содержит V_H CDR1, V_H CDR2 и V_H CDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79-81, 85-87, 91-93, 97-99, 103-105, 109-111, 115-117, 121-123, 127-129, 133-135, 139-141, 145-147, 151-153, 157-159 или 163-165.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению содержит одну, две или три V_L CDR, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей, выбранных из груп-

пы, состоящей из SEQ ID NO: 82-84, 88-90, 94-96, 100-102, 106-108, 112-114, 118-120, 124-126, 130-132, 136-138, 142-144, 148-150, 154-156, 160-162, 166-168 и 224.

В одном варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению содержит VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 82-84, 88-90, 94-96, 100-102, 106-108, 112-114, 118-120, 124-126, 130-132, 136-138, 142-144, 148-150, 154-156, 160-162 или 166-168. В одном варианте реализации изобретения VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 содержат, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 83, 84 и 224.

Согласно одному варианту реализации изобретения антитело согласно изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 или 163; VH CDR2 из SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 или 164; или VH CDR3 из SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 или 165. Согласно другому варианту реализации изобретения антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 или 224; VL CDR2 из SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 или 167; или VL CDR3 из SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 или 168. В другом варианте реализации изобретения антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 или 163; VH CDR2 из SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 или 164; или VH CDR3 из SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 или 165, и дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 или 224; VL CDR2 из SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 или 167; или VL CDR3 из SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 или 168.

Согласно одному варианту реализации изобретения антитело согласно изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 или 163; VH CDR2 из SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 или 164; и VH CDR3 из SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 или 165. Согласно другому варианту реализации изобретения антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 или 224; VL CDR2 из SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 или 167; и VL CDR3 из SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 или 168. В другом варианте реализации изобретения антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 или 163; VH CDR2 из SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 или 164; и VH CDR3 из SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 или 165, и дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 или 224; VL CDR2 из SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 или 167; и VL CDR3 из SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 или 168.

В одном варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 79, VH CDR2 из SEQ ID NO: 80, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 81, и может дополнительно содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 82, VL CDR2 из SEQ ID NO: 83, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 84.

В одном варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 79, VH CDR2 из SEQ ID NO: 80, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 81, и может дополнительно содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 224, VL CDR2 из SEQ ID NO: 83, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 84.

В одном варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую V_H CDR1 из SEQ ID NO: 85, V_H CDR2 из SEQ ID NO: 86, и V_H CDR3 из SEQ ID NO: 87, и может дополнительно содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую V_L CDR1 из SEQ ID NO: 88, V_L CDR2 из SEQ ID NO: 89, и V_L CDR3 из SEQ ID NO: 90.

В одном варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую V_H CDR1 из SEQ ID NO: 91, V_H CDR2 из SEQ ID NO: 92, и V_H CDR3 из SEQ ID NO: 93, и может дополнительно содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую V_L CDR1 из SEQ ID NO: 94, V_L CDR2 из SEQ ID NO: 95, и V_L CDR3 из SEQ ID NO: 96.

В одном варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 97, VH CDR2 из SEQ ID NO: 98, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 99, и может дополнительно содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 100, VL CDR2 из SEQ ID NO: 101, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 102.

В одном варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 103, VH CDR2 из SEQ ID NO: 104, и V_H CDR3 из SEQ ID NO: 105, и может дополнительно содержать вариабельную область легкой

цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 106, VL CDR2 из SEQ ID NO: 107, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 108.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 109, VH CDR2 из SEQ ID NO: 110, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 111, и может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 112, VL CDR2 из SEQ ID NO: 113, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 114.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 115, VH CDR2 из SEQ ID NO: 116, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 117, и может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 118, VL CDR2 из SEQ ID NO: 119, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 120.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 121, VH CDR2 из SEQ ID NO: 122, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 123, и может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 124, VL CDR2 из SEQ ID NO: 125, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 126.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 127, VH CDR2 из SEQ ID NO: 128, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 129, и может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 130, VL CDR2 из SEQ ID NO: 131, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 132.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 133, VH CDR2 из SEQ ID NO: 134, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 135, и может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 136, VL CDR2 из SEQ ID NO: 137, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 138.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 139, VH CDR2 из SEQ ID NO: 140, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 141, и может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 142, VL CDR2 из SEQ ID NO: 143, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 144.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 145, VH CDR2 из SEQ ID NO: 146, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 147, и может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 148, VL CDR2 из SEQ ID NO: 149, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 150.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 151, VH CDR2 из SEQ ID NO: 152, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 153, и может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 154, VL CDR2 из SEQ ID NO: 155, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 156.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 157, VH CDR2 из SEQ ID NO: 158, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 159, и может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 160, VL CDR2 из SEQ ID NO: 161, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 162.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую VH CDR1 из SEQ ID NO: 163, VH CDR2 из SEQ ID NO: 164, и VH CDR3 из SEQ ID NO: 165, и может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую VL CDR1 из SEQ ID NO: 166, VL CDR2 из SEQ ID NO: 167, и VL CDR3 из SEQ ID NO: 168.

В одном варианте реализации изобретения антители согласно настоящему изобретению представляет собой любое антители, содержащее аминокислотную последовательность V_H- и/или V_L-области, приведенную на фиг. 7 и в табл. 3. В одном варианте реализации изобретения антители согласно настоящему изобретению характеризуется сохранением когнатного спаривания тяжелой и легкой цепей, которое присутствует в человеческой В-клетке.

Таблица 3
Аминокислотные последовательности V_H- и V_L-области
тау-специфических антител. ДГ - до гуманизирования

Антитело	Аминокислотные последовательности вариабельной тяжелой (VH) и вариабельной легкой (VL) цепей	
NI-105.17C1	ДГ V _H	SEQ. ID. NO:44
	V _H	SEQ. ID. NO:45
	V _L	SEQ. ID. NO:46
	N31QV _L	SEQ. ID. NO:221
	N31Q, I48VV _L	SEQ. ID. NO:222
NI-105.6C5	ДГ V _H	SEQ. ID. NO:47
	V _H	SEQ. ID. NO:48
	V _L	SEQ. ID. NO:49
NI-105.29G10	V _H	SEQ. ID. NO:50
	V _L	SEQ. ID. NO:51
NI-105.6L9	V _H	SEQ. ID. NO:52
	V _L	SEQ. ID. NO:53
NI-105.40E8	V _H	SEQ. ID. NO:54
	R104W V _H	SEQ. ID. NO:220
	V _L	SEQ. ID. NO:55
NI-105.48E5	V _H	SEQ. ID. NO:56
	V _L	SEQ. ID. NO:57
NI-105.6E3	V _H	SEQ. ID. NO:58
	V _L	SEQ. ID. NO:59
NI-105.22E1	V _H	SEQ. ID. NO:60
	V _L	SEQ. ID. NO:61
NI-105.26B12	V _H	SEQ. ID. NO:62
	ДГ V _L	SEQ. ID. NO:63
	V _L	SEQ. ID. NO:64
NI-105.12E12	V _H	SEQ. ID. NO:65
	V _L	SEQ. ID. NO:66
NI-105.60E7	V _H	SEQ. ID. NO:67
	V _L	SEQ. ID. NO:68
NI-105.14E2	V _H	SEQ. ID. NO:69
	V _L	SEQ. ID. NO:70
NI-105.39E2	V _H	SEQ. ID. NO:71
	V _L	SEQ. ID. NO:72
NI-105.19C6	V _H	SEQ. ID. NO:73
	V _L	SEQ. ID. NO:74
NI-105.9C4	ДГ V _H	SEQ. ID. NO:75
	V _H	SEQ. ID. NO:76
	ДГ V _L	SEQ. ID. NO:77
	V _L	SEQ. ID. NO:78

В одном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76 и 220. В одном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221 и 222. В одном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76 и 220, и дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221 и 222. В конкретном варианте реализации изобретения антитело содержит VH из SEQ ID NO: 45 и VL из SEQ ID NO: 46; или VH из SEQ ID NO: 45 и VL из SEQ ID NO: 221; или VH из SEQ ID NO: 45 и

VL из SEQ ID NO: 222; или VH из SEQ ID NO: 48 и VL из SEQ ID NO: 49; или VH из SEQ ID NO: 50 и VL из SEQ ID NO: 51; или VH из SEQ ID NO: 52 и VL из SEQ ID NO: 53; или VH из SEQ ID NO: 54 и VL из SEQ ID NO: 55; или VH из SEQ ID NO: 220 и VL из SEQ ID NO: 55; или VH из SEQ ID NO: 56 и VL из SEQ ID NO: 57; или VH из SEQ ID NO: 58 и VL из SEQ ID NO: 59; или VH из SEQ ID NO: 60 и VL из SEQ ID NO: 61; или VH из SEQ ID NO: 62 и VL из SEQ ID NO: 64; или VH из SEQ ID NO: 65 и VL из SEQ ID NO: 66; или VH из SEQ ID NO: 67 и VL из SEQ ID NO: 68; или VH из SEQ ID NO: 69 и VL из SEQ ID NO: 70; или VH из SEQ ID NO: 71 и VL из SEQ ID NO: 72; или VH из SEQ ID NO: 73 и VL из SEQ ID NO: 74; или VH из SEQ ID NO: 76 и VL из SEQ ID NO: 78; или VH из SEQ ID NO: 44 и VL из SEQ ID NO: 46; или VH из SEQ ID NO: 47 и VL из SEQ ID NO: 49; или VH из SEQ ID NO: 62 и VL из SEQ ID NO: 63; или VH из SEQ ID NO: 75 и VL из SEQ ID NO: 77.

В альтернативном варианте антитело согласно настоящему изобретению представляет собой анти-тело или его антигенсвязывающий фрагмент, производное или вариант, которое конкурирует за связывание с тау, например hTau40, по меньшей мере с одним из антител, имеющих V_H - и/или V_L -область, приведенную на фиг. 7 и в табл. 3. В одном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению конкурирует за специфическое связывание с hTau40 с NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6 или NI-105.9C4. Эти антитела также могут быть человеческими, в частности, для терапевтических применений. В альтернативном варианте антитело представляет собой мышинное, муринизированное и химерное мышино-человеческое антитело, которое является особенно подходящим для диагностических методов и исследований на животных.

В одном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению получают из культур одиночных или олигоклональных В-клеток, которые культивируют, а супернатант культуры, который содержит антитела, вырабатываемые В-клетками, исследуют в отношении наличия в нем анти-тау антител и их аффинности. Процесс исследования включает этапы чувствительного анализа иммуно-реактивности тканевых бляшек (TAPIR), описанного в международной заявке WO2004/095031, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки; исследования срезов мозга в отношении связывания с PHFТау; исследования в отношении связывания пептида, полученного из тау с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, с фосфатными группами на аминокислотах Ser-202 и Thr-205; на аминокислоте Thr-231; и/или на аминокислотах Ser-396 и Ser-404 указанной последовательности; исследования в отношении связывания рекомбинантного человеческого тау с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, и выделения антитела, для которого выявлено связывание, или клетки, вырабатывающей указанное антитело.

Как указано выше, благодаря тому, что их генерация происходит вследствие человеческого иммунного ответа, человеческие моноклональные антитела согласно настоящему изобретению будут распознавать эпитопы, имеющие конкретную патологическую значимость, и которые могли быть недоступными или менее иммуногенными в случае применения иммунизации для генерации, например, мышинных моноклональных антител и *in vitro* скрининга полученных методом фагового дисплея библиотек, соответственно. Таким образом, следует оговорить, что эпитоп человеческого анти-тау антитела согласно настоящему изобретению является уникальным, и не существует ни одного другого антитела, способного связываться с эпитопом, распознаваемым человеческим моноклональным антителом согласно настоящему изобретению. Следовательно, настоящее изобретение в целом распространяется также на анти-тау антитела и тау-связывающие молекулы, которые конкурируют с человеческим моноклональным антителом согласно настоящему изобретению за специфическое связывание с тау. А именно, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, при этом антитело специфически связывается с тем же самым эпитопом тау, что и стандартное антитело, выбранное из группы, состоящей из NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6 и NI-105.9C4.

Конкурирование между антителами определяют методом анализа, в котором исследуемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание стандартного антитела с общим антигеном, например тау. Известно большое количество методов анализа конкурентного связывания, например твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой ферментный иммуноанализ (EIA), конкурентный "сэндвич"-анализ; см. Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; твердофазный прямой EIA с биотином-авидином; см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 и Cheung et al., *Virology* 176 (1990), 546-552; твердофазный прямой анализ с применением меток, твердофазный прямой "сэндвич"-анализ с применением меток; см. Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); твердофазный прямой RIA с применением I^{125} -метки; см. Morel et al., *Molec. Immunol.* 25 (1988), 7-15 и Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32 (1990), 77-82. Как правило, такой метод анализа включает применение очищенного тау или его агрегатов, связанных с твердой поверхностью, или клеток, содержащих любой из этих компонентов, немеченого исследуемого иммуноглобулина и меченого стандартного иммуноглобулина, т.е. человеческого моноклонального антитела согласно настоящему изобретению. Конкурентное ингибирование оценивают, определяя количе-

ство меченого вещества, связанного с твердой поверхностью или клетками в присутствии исследуемого иммуноглобулина. Обычно исследуемый иммуноглобулин присутствует в избытке. В одном варианте реализации изобретения анализ конкурентного связывания проводят в условиях, описанных в приложенных Примерах для анализа ELISA. Антитела, определенные в результате конкурентного анализа (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же самым эпитопом, что и стандартное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным достаточно близко к эпитопу, связываемому стандартным антителом, для появления стерического несоответствия. Обычно, когда конкурирующее антитело находится в избытке, оно будет ингибировать специфическое связывание стандартного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50 или 75%. Следовательно, настоящее изобретение дополнительно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, варианту или производным, при этом антитело конкурентно ингибирует связывание тау стандартным антителом, выбранным из группы, состоящей из NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6 или NI-105.9C4.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полипептид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), при этом по меньшей мере одна из V_H -CDR вариабельной области тяжелой цепи или по меньшей мере две V_H -CDR вариабельной области тяжелой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны аминокислотным последовательностям V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 стандартной тяжелой цепи раскрытых в данном документе антител. В альтернативном варианте V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 области V_H по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны аминокислотным последовательностям V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 стандартной тяжелой цепи раскрытых в данном документе антител. Таким образом, в соответствии с этим вариантом реализации изобретения вариабельная область тяжелой цепи согласно изобретению содержит полипептидные последовательности V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, родственные группам, приведенным на фиг. 7. Хотя на фиг. 7 приведены V_H -CDR, определенные согласно системе Кабата, другие определения CDR, например V_H -CDR, определенные по системе Хотиа, также включены в настоящее изобретение и могут быть без труда определены специалистом в данной области техники по данным, представленным на фиг. 7. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной V_H CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 или 163; аминокислотная последовательность стандартной V_H CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 или 164; и аминокислотная последовательность стандартной V_H CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 или 165.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полипептид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), в которой области V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 содержат полипептидные последовательности, идентичные группам V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, приведенным на фиг. 7. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность V_H CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 или 163; аминокислотная последовательность V_H CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 или 164; и аминокислотная последовательность V_H CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 или 165.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), в которой области V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 содержат полипептидные последовательности, идентичные группам V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, приведенным на фиг. 7, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислотных замен в любой из V_H -CDR. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотные замены являются консервативными. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность V_H CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 или 163; аминокислотная последовательность V_H CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 или 164; и аминокислотная последовательность V_H CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 или 165.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полипептид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), при этом по меньшей мере одна из V_L -CDR вариабельной области легкой цепи или по меньшей мере две V_L -CDR вариабельной области легкой цепи по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны аминокислотным последовательностям V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3 стандартной легкой цепи описанных в данном документе антител. В альтернативном варианте V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 области V_L по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны аминокислотным последовательностям V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 стандартной легкой цепи описанных в

данном документе антител. Таким образом, в соответствии с этим вариантом реализации изобретения переменная область легкой цепи согласно изобретению содержит полипептидные последовательности V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, родственные полипептидам, приведенным на фиг. 7. Хотя на фиг. 7 приведены V_L -CDR, определенные согласно системе Кабата, другие определения CDR, например V_L -CDR, определенные по системе Хотиа, также включены в настоящее изобретение. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной VL CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 или 224; аминокислотная последовательность стандартной VL CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 или 167; и аминокислотная последовательность стандартной VL CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 или 168.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полипептид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из переменной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), в которой области V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 содержат полипептидные последовательности, идентичные группам V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, приведенным на фиг. 7. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность VL CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 или 224; аминокислотная последовательность VL CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 или 167; и аминокислотная последовательность VL CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 или 168.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полипептид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из переменной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), в которой области V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 содержат полипептидные последовательности, идентичные группам V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, приведенным на фиг. 7, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислотных замен в любой из V_L -CDR. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотные замены являются консервативными. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность VL CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 или 224; аминокислотная последовательность VL CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 или 167; и аминокислотная последовательность VL CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 или 168.

В другом варианте реализации в изобретении предлагается выделенный полипептид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), идентичной стандартной переменной области тяжелой цепи, приведенной на фиг. 7 и в табл. 3. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76 или 220.

В другом варианте реализации в изобретении предлагается выделенный полипептид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащей полипептидную последовательность, идентичную последовательности стандартной переменной области тяжелой цепи (V_H), приведенной на фиг. 7 и в табл. 3, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислотных замен. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотные замены являются консервативными. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76 или 220.

Согласно одному варианту реализации в изобретении предлагается выделенный полипептид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из переменной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной аминокислотной последовательности стандартной переменной области легкой цепи (V_L) описанных в данном документе антител. Таким образом, в соответствии с этим вариантом реализации изобретения переменная область легкой цепи согласно изобретению содержит полипептидную последовательность, родственную переменным областям легкой цепи, приведенным на фиг. 7 и в табл. 3. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной переменной области легкой цепи (V_L) содержит SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221 или 222.

В другом варианте реализации в изобретении предлагается выделенный полипептид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из переменной области легкой цепи иммуноглобулина (V_L), идентичной стандартной переменной области легкой цепи, приведенной на фиг. 7 и в табл. 3. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221 или 222.

В другом варианте реализации в изобретении предлагается выделенный полипептид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из переменной области легкой цепи иммуноглобулина

(V_L), содержащей полипептидную последовательность, идентичную последовательности стандартной варибельной области легкой цепи (V_L), приведенной на фиг. 7 и в табл. 3, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислотных замен. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотные замены являются консервативными. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной варибельной области легкой цепи содержит SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221 или 222.

Иммуноглобулин или кодирующую его кДНК можно дополнительно модифицировать. Таким образом, в дополнительном варианте реализации изобретения способ согласно настоящему изобретению включает любой из этапов получения химерного антитела, муринизированного антитела, одноцепочечного антитела, Fab-фрагмента, биспецифического антитела, слитого антитела, меченого антитела или аналога любого из этих компонентов. Специалисту в данной области техники известны соответствующие способы, которые описаны, например, в Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Когда производные указанных антител получают методом фагового дисплея, можно использовать применяемый в системе BIAcore метод поверхностного плазмонного резонанса для повышения эффективности фаговых антител, которые связываются с тем же самым эпитопом, что и любое из описанных в данном документе антител (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). Получение химерных антител описано, например, в международной заявке WO 89/09622. Способы получения гуманизированных антител описаны, например, в Европейской заявке EP-A1 0239400 и международной заявке WO 90/07861. Дополнительным источником антител, который можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, являются так называемые ксеногенные антитела. Общий принцип получения ксеногенных антител, таких как человекоподобные антитела, от мышей описан, например, в международных заявках WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 и WO 96/33735. Как обсуждалось выше, антитело согласно изобретению может существовать во множестве разных форм помимо полных антител; включая, например, Fv, Fab и F(ab)₂, а также одиночные цепи; см., например, международную заявку WO 88/09344.

Антитела согласно настоящему изобретению или их соответствующие иммуноглобулиновые цепи можно дополнительно модифицировать при помощи известных в данной области техники общепринятых методов, например при помощи аминокислотной(ых) делеции(й), инсерции(й), замены(замен), дополнения(й) и/или рекомбинации(й) и/или любой другой(их) модификации(й), известной в данной области техники, как отдельно, так и в комбинации. Способы внесения таких модификаций в последовательность ДНК, лежащую в основе аминокислотной последовательности иммуноглобулиновой цепи, хорошо известны специалисту в данной области техники; см., например, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. и Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Модификации антитела согласно изобретению включают химическую и/или ферментативную дериватизацию в одной или более из составляющих аминокислот, включая модификацию боковых цепей, модификацию скелета и N- и C-терминальные модификации, включая ацетилирование, гидроксилирование, метилирование, амидирование и присоединение углеводных или липидных компонентов, кофакторов и тому подобное. Аналогично, настоящее изобретение включает в себя получение химерных белков, которые содержат описанное антитело или какой-либо его фрагмент в аминоконце, слитое с гетерологичной молекулой, такой как иммуностимулирующий лиганд, в карбоксильном конце; для ознакомления с соответствующими техническими подробностями см., например, международную заявку WO 00/30680.

Дополнительно настоящее изобретение включает в себя пептиды, включая такие, которые были описаны выше и содержат связывающие молекулы, например, содержат CDR3-область варибельной области любого из упоминаемых антител, в частности CDR3 тяжелой цепи, так как часто наблюдалось, что CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) является областью, имеющей большую степень варибельности и преобладающее влияние на взаимодействие антиген-антитело. Такие пептиды можно легко синтезировать или получить рекомбинантными способами получения связывающего агента, примененного в соответствии с изобретением. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники. Пептиды можно синтезировать, например, при помощи автоматических синтезаторов пептидов, которые являются коммерчески доступными. Также пептиды можно получить рекомбинантными способами, путем внесения в экспрессионный вектор ДНК, экспрессирующей пептид, и трансформирования клеток экспрессионным вектором для получения пептида.

Следовательно, настоящее изобретение относится к любой связывающей молекуле, например антителу или его связывающему фрагменту, которая ориентирована в отношении человеческих анти-тау антител согласно настоящему изобретению и демонстрирует указанные свойства, т.е. которая специфически распознает тау. Специфичность связывания и аффинность таких антител и связывающих молекул можно исследовать методами ELISA и вестерн-блоттинга, а также иммуногистохимии, описанными в данном документе, см., например, "Примеры". Кроме того, предварительные результаты последующих экспериментов, проводимых в соответствии с настоящим изобретением, дополнительно выявили, что в одном варианте реализации изобретения человеческое анти-тау антитело согласно настоящему изобретению связывается преимущественно с патологически агрегированным тау, сходным с нейрофибриляр-

ными клубками (НФК), нейропилыми нитями, присутствующими в срезах головного мозга человека, полученных от пациентов, страдавших болезнью Альцгеймера (БА). Таким образом, в конкретном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения человеческое антитело или его связывающий фрагмент, производное или вариант распознает тау в срезах головного мозга человека с БА.

В альтернативном варианте для получения иммуноглобулинов непосредственно из культуры иммортализованных В-клеток или В-клеток памяти иммортализованные клетки можно использовать в качестве источника перестроенных локусов тяжелой цепи и легкой цепи для последующей экспрессии и/или генетической манипуляции. Перестроенные гены антитела можно обратно транскрибировать с соответствующих мРНК для получения кДНК. При необходимости константную область тяжелой цепи можно заменить на область другого изотипа или полностью удалить. Варибельные области можно соединять для кодирования одноцепочечных Fv-областей. Множественные Fv-области можно соединить, чтобы обеспечить способность связывания с более чем одной мишенью, или можно использовать комбинации химерной тяжелой и легкой цепи. При наличии генетического материала конструирование вышеописанных аналогов, которые сохраняют способность связывать необходимую мишень, не вызывает затруднений. Способы клонирования варибельных областей антитела и получения рекомбинантных антител известны специалисту в данной области техники и описаны, например, в Gilliland et al., *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

После того, как подходящий генетический материал был получен и, при желании, модифицирован для кодирования аналога, кодирующие последовательности, включая те, которые кодируют, как минимум, варибельные области тяжелой и легкой цепи, можно вставлять в экспрессионные системы, содержащиеся в векторах, которые можно трансфицировать в стандартные рекомбинантные клетки-хозяева. Можно использовать большое количество таких клеток-хозяев; при этом для эффективного процессинга можно рассматривать применение клеток млекопитающих. Типичные клеточные линии млекопитающих, применимые в этих целях, включают, но не ограничиваются этим, клетки CHO, клетки HEK 293 или клетки NSO.

Затем получение антитела или его аналога включает культивирование модифицированного рекомбинантного хозяина в культуральных условиях, подходящих для роста клеток-хозяев и экспрессии кодирующих последовательностей. Затем антитела получают, выделяя их из культуры. Экспрессионные системы сконструированы так, чтобы содержать сигнальные пептиды, чтобы полученные в результате антитела секретировались в среду; при этом возможно также внутриклеточное получение.

В соответствии с вышеизложенным, настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему антитело или эквивалентную ему связывающую молекулу согласно изобретению. В одном варианте реализации изобретения полинуклеотид кодирует по меньшей мере варибельную область цепи иммуноглобулина вышеописанного антитела. Как правило, указанная варибельная область, кодируемая полинуклеотидом, содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) V_H и/или V_L варибельной области указанного антитела.

Специалисту в данной области техники понятно, что варибельный домен антитела, имеющего вышеописанный варибельный домен, можно использовать для конструирования других полипептидов или антител с желаемой специфичностью и биологической функцией. Таким образом, настоящее изобретение также включает в себя полипептиды и антитела, содержащие по меньшей мере одну CDR из вышеописанного варибельного домена, которые преимущественно имеют практически такие же или сходные связывающие свойства, что и антитело, описанное в приложенных примерах. Специалисту в данной области техники известно, что аффинность связывания можно повысить, проводя аминокислотные замены в пределах CDR или в пределах гиперварибельных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917), которые частично перекрываются с CDR согласно определению Кабата; см., например, Riechmann, et al., *Nature* 332(1988), 323-327. Таким образом, настоящее изобретение также относится к антителам, в которых одна или более из указанных CDR содержат одну или более или не более чем две аминокислотные замены. В одном варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению содержит в одной или обеих цепях иммуноглобулина две или все три CDR варибельных областей, приведенные на фиг. 1.

Как известно специалистам в данной области техники, связывающие молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению, могут содержать константную область, которая опосредует одну или более эффекторных функций. Например, связывание компонента C1 комплемента с константной областью антитела может активировать систему комплемента. Активация комплемента важна при опсонизации и лизисе клеточных патогенов. Активация комплемента также стимулирует воспалительный ответ и может играть роль в аутоиммунной гиперчувствительности. Кроме того, антитела связываются с рецепторами различных клеток посредством Fc-области, при этом участок связывания Fc-рецептора в Fc-области антитела связывается с Fc-рецептором (FcR) клетки. Существует большое количество Fc-рецепторов, которые являются специфичными для разных классов антител, включая IgG (гамма-рецепторы), IgE (эпсилон-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgM (мю-рецепторы). Связывание антитела с Fc-рецепторами на поверхности клеток вызывает большое количество важных и разнообразных биологических ответов, включая поглощение и раз-

рушение покрытых антителами частиц, клиренс иммунных комплексов, лизис покрытых антителами клеток-мишеней клетками-киллерами (называемый антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью, или АЗКЦ), высвобождение воспалительных медиаторов, плацентарный перенос и контроль выработки иммуноглобулина.

Соответственно, определенные варианты реализации настоящего изобретения включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, в котором по меньшей мере одна часть одного или более доменов константной области была удалена или изменена каким-либо другим способом, чтобы обеспечить желаемые биохимические характеристики, такие как сниженные эффекторные функции, способность к нековалентной димеризации, повышенная способность к локализации на участке агрегации и отложений тау, сниженное время полужизни в сыворотке крови или повышенное время полужизни в сыворотке крови по сравнению с полным, неизмененным антителом приблизительно с такой же иммуногенностью. Например, определенные антитела для применения в описанных в данном документе диагностических и лечебных способах представляют собой антитела с удалением доменов, которые содержат полипептидную цепь, сходную с тяжелой цепью иммуноглобулина, в которой отсутствует по меньшей мере часть одного или более доменов тяжелой цепи. Например, в определенных антителах будет удален один полный домен константной области модифицированного антитела, например, будет удален весь или часть CH2-домена. В других вариантах реализации изобретения определенные антитела для применения в описанных в данном документе диагностических и лечебных способах имеют константную область, например константную область тяжелой цепи IgG, которая изменена в целях устранения гликозилирования, и называются в данном документе агликозилированными или "agly"-антителами. Такие "agly"-антитела можно получить ферментативным путем, а также путем конструирования консенсусного(ых) участка(ов) гликозилирования в константной области. Не привязываясь к теории, считается, что "agly"-антитела могут иметь улучшенные профили безопасности и стабильности *in vivo*. Примеры способов получения агликозилированных антител, имеющих желаемую эффекторную функцию, можно найти в международной заявке WO 2005/018572, которая в полном объеме включена посредством ссылки.

В некоторых описанных в данном документе антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных Fc-часть может быть мутированной для снижения эффекторной функции при помощи известных в данной области техники методов. Например, удаление или инактивация (путем введения точечных мутаций или другими способами) домена константной области может снизить связывание Fc-рецептора циркулирующего модифицированного антитела, тем самым повышая степень локализации тау. В других случаях модификации константной области в соответствии с настоящим изобретением могут сдерживать связывание комплемента и таким образом снижать сывороточное время полужизни и неспецифическую ассоциацию конъюгированного цитотоксина. Другие модификации константной области можно применять для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных компонентов, что способствует повышению степени локализации вследствие увеличения специфичности антигена или гибкости антитела. Результирующий физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты модификаций, такие как локализация, биораспределение и сывороточное время полужизни, можно легко определить и количественно оценить при помощи хорошо известных иммунологических методов, не проводя ненужных экспериментов.

В некоторых описанных в данном документе антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных Fc-часть может быть мутированной или замененной на альтернативные белковые последовательности для повышения клеточного поглощения антител, например, путем повышения рецептор-опосредованного эндоцитоза антител Fcγ-рецепторами, LRP или Thy1-рецепторами, или путем "технологии супер-антитела", которая, как считается, обеспечивает возможность переноса антител в живые клетки, не повреждая их (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). Например, генерация слитых белков связывающей области антитела и когнатных белковых лигандов рецепторов клеточной поверхности или би- и мультиспецифических антител с определенными последовательностями, связывающимися с тау, а также рецептором клеточной поверхности, может быть осуществлена известными в данной области техники методами.

В некоторых описанных в данном документе антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, вариантах или производных Fc-часть может быть мутированной или замененной на альтернативные белковые последовательности или антитело может быть химически модифицированным для повышения его проникновения через гематоэнцефалический барьер.

Модифицированные формы антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно изобретению могут быть получены из полных предшественников или родительских антител при помощи известных в данной области техники методов. Более подробно типовые методы обсуждаются в данном документе. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению могут быть получены или произведены при помощи известных в данной области техники методов. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы антител или их фрагментов "получены рекомбинантным путем", т.е. получены при помощи технологии рекомбинантных ДНК. Более подробно типовые методы получения молекул антител или их фрагментов обсуждаются в

данном документе.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению также включают производные, модифицированные, например, путем ковалентного присоединения к антителу молекулы любого типа таким образом, что ковалентное присоединение не препятствует специфическому связыванию антитела со своим когнатным эпитопом. Например, без ограничений, производные антител включают антитела, которые были модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.д. При помощи известных методов можно проводить любые из многочисленных химических модификаций, включая, но не ограничиваясь этим, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Дополнительно производное может содержать одну или более неклассических аминокислот.

В конкретных вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению не вызывают нежелательный иммунный ответ у подходящего лечения животного, например у человека. В некоторых вариантах реализации изобретения связывающие молекулы, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, получены от пациента, например пациента-человека, и впоследствии применяются на тех же самых видах, от которых они были получены, например, на людях, уменьшая или минимизируя возникновение нежелательных иммунных ответов.

Для снижения иммуногенности антитела также можно применять деиммунизацию. Употребляемый в данном документе термин "деиммунизация" включает в себя изменение антитела для модификации эпитопов Т-клеток; см., например, международные заявки WO 98/52976 и WO 00/34317. Например, проводят анализ последовательностей V_H и V_L исходного антитела и получают "карту" эпитопов человеческих Т-клеток для каждой V-области, которая показывает расположение эпитопов по отношению к определяющим комплементарность областям (CDR) и другим ключевым остаткам в последовательности. Проводят анализ отдельных эпитопов Т-клеток с карты эпитопов Т-клеток, чтобы определить альтернативные аминокислотные замены с низким риском изменения активности конечного антитела. Получают набор альтернативных последовательностей V_H и V_L , содержащих комбинации аминокислотных замен, и затем вносят эти последовательности в набор связывающих полипептидов, например тау-специфических антител или их иммуноспецифических фрагментов, для применения в описанных в данном документе диагностических и лечебных способах, которые затем исследуют в отношении функциональности. Как правило, генерируют и исследуют от 12 до 24 вариантных антител. Затем полные гены тяжелой и легкой цепей, содержащие модифицированные V- и человеческие C-области, клонируют в экспрессионные векторы, а полученные плазмиды вносят в клеточные линии для получения полного антитела. Затем проводят сравнение антител подходящими методами биохимического и биологического анализа и определяют оптимальный вариант.

Моноклональные антитела можно получить при помощи большого количества различных известных в данной области техники методов, включая применение гибридомных, рекомбинантных технологий и технологии фагового дисплея, а также их комбинаций. Например, моноклональные антитела можно получить при помощи гибридомных технологий, включая технологии, известные в данной области техники и изложенные, например, в Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981), которые в полном объеме включены посредством ссылки. Употребляемый в данном документе термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными при помощи гибридомной технологии. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, но не к способу, которым оно было получено. Таким образом, термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными при помощи гибридомной технологии. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела согласно настоящему изобретению получены из человеческих В-клеток, которые были иммортализованы посредством трансформации вируса Эпштейна-Барр, как описано в данном документе.

В хорошо известном гибридомном методе (Kohler et al., *Nature* 256 (1975), 495) относительно короткоживущие или мортальные лимфоциты млекопитающих, например В-клетки, полученные от человеческого субъекта, как описано в данном документе, слиты с иммортальной опухолевой клеточной линией (например, клеточной линией миеломы) и образуют, таким образом, гибридные клетки или "гибридомы", которые являются как иммортальными, так и способными вырабатывать генетически кодируемое антитело В-клетки. Полученные в результате гибриды выделяют в единичные генетические штаммы путем селекции, разведения и повторного выращивания, при этом каждый отдельный штамм содержит определенные гены, необходимые для образования одного антитела. Они вырабатывают антитела, которые являются гомогенными против желаемого антигена и в связи с их чистым генетическим происхождением называются "моноклональными".

Полученные таким образом гибридомные клетки высевают и выращивают в подходящей культу-

ральной среде, содержащей одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых родительских клеток миеломы. Специалистам в данной области техники понятно, что реагенты, клеточные линии и среды для формирования, селекции и выращивания гибридом коммерчески доступны из большого количества источников, а стандартизированные протоколы хорошо отработаны. Как правило, культуральную среду, в которой растут гибридомные клетки, анализируют в отношении выработки моноклональных антител против желаемого антигена. Специфичность связывания моноклональных антител, полученных из гибридомных клеток, определяют описанными в данном документе методами *in vitro* анализа, такими как иммунопреципитация, радиоиммуноанализ (RIA) или ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA). После определения, что гибридомные клетки вырабатывают антитела с желаемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны можно субклонировать методом предельного разведения и выращивать стандартными способами; см., например, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, p. 59-103 (1986). Также следует понимать, что моноклональные антитела, секретируемые субклонами, можно отделить от культуральной среды, свободной жидкости брюшной полости или сыворотки крови общепринятыми методами очистки, такими как, например, хроматография с протеином-A, гидроксиапатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

В другом варианте реализации изобретения можно проводить селекцию лимфоцитов посредством микроманипуляций и выделять вариабельные гены. Например, моноклональные клетки периферической крови можно выделять из иммунизированных или природно иммунных млекопитающих, например людей, и культивировать на протяжении около 7 дней *in vitro*. Можно проводить скрининг культур в отношении специфических IgG, которые соответствуют критериям скрининга. Клетки из положительных лунок можно выделять. Отдельные, вырабатывающие Ig B-клетки можно выделять методом FACS или путем их идентификации методом анализа комплемент-опосредованного гемолитического бляшкообразования. Вырабатывающие Ig B-клетки можно поместить в колбу и амплифицировать гены V_H и V_L при помощи, например, ОФ-ПЦР. Гены V_H и V_L можно клонировать в экспрессионный вектор антитела и трансфицировать в клетки (например, эукариотические или прокариотические клетки) для экспрессии.

В альтернативном варианте вырабатывающие антитела клеточные линии можно селективировать и культивировать при помощи методов, хорошо известных специалисту в данной области техники. Такие методы описаны в большом количестве лабораторных руководств и первичных публикаций. В этом отношении описанные ниже методы, подходящие для применения в данном изобретении, описаны в *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), которые в полном объеме, включая приложения, включены в данный документ посредством ссылки.

Фрагменты антител, которые распознают специфичные эпитопы, можно получить известными методами. Например, фрагменты Fab и $F(ab')_2$ можно получить рекомбинантным путем или путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с применением ферментов, таких как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов $F(ab')_2$). Фрагменты $F(ab')_2$ содержат вариабельную область, константную область легкой цепи и CH1-домен тяжелой цепи. Таких фрагментов достаточно для применения, например, в иммунодиагностических процедурах, в которых используется сопряжение иммуноспецифических частей иммуноглобулинов с выявляющими реагентами, такими как радиоизотопы.

Описанные в данном документе человеческие антитела в особенности необходимы для терапевтического применения в случае человеческих пациентов. Человеческие антитела согласно настоящему изобретению выделены, например, из здоровых человеческих субъектов, которые в силу своего возраста могут находиться в зоне риска развития аутопатического нарушения, например болезни Альцгеймера, или пациента, имеющего нарушение, но с необычно стабильной динамикой заболевания. При этом, хотя целесообразно ожидать, что более взрослые здоровые и, соответственно, бессимптомные субъекты будут более систематически вырабатывать защитные анти-ауто антитела, чем молодые субъекты, последние также могут быть источником для получения человеческого антитела согласно настоящему изобретению. В особенности это касается более молодых пациентов, которые предрасположены к развитию семейной формы аутопатического заболевания, но остаются бессимптомными, так как их иммунная система функционирует более эффективно, чем у более взрослых людей.

В одном варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере одну CDR тяжелой или легкой цепи молекулы антитела. В другом варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере две CDR из одной или более молекул антител. В другом варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере три CDR из одной или более молекул антител. В другом варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере четыре CDR из одной или более молекул антител. В другом варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере пять CDR из одной или более молекул антител. В другом варианте реализации изобретения антитело согласно изобретению содержит по меньшей мере шесть CDR из одной или более молекул антител. Типовые молекулы антител, содержащие по меньшей мере одну CDR, которые могут быть включены в антитело согласно изобретению, описаны в данном документе.

Антитела согласно настоящему изобретению можно получить любым известным в данной области техники методом синтеза антител, в частности путем химического синтеза или рекомбинантными методами экспрессии, как описано в данном документе.

В одном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное согласно изобретению содержит синтетическую константную область, в которой частично или полностью удален один или более доменов ("антитела с удалением доменов"). В некоторых вариантах реализации изобретения соответствующие модифицированные антитела содержат конструкции с удалением доменов или варианты, в которых полностью удален СН2-домен (Δ СН2-конструкции). В других вариантах реализации изобретения удаленный домен может быть заменен коротким соединительным пептидом, чтобы обеспечить гибкость и свободу движения вариабельной области. Специалистам в данной области техники понятно, что такие конструкции являются в особенности предпочтительными из-за регуляторных свойств СН2-домена, которые влияют на скорость катаболизма антитела. Конструкции с удалением доменов можно получить при помощи вектора, кодирующего человеческий константный домен IgG₁, см., например, международные заявки WO 02/060955 и WO 02/096948A2. Этот вектор конструируют так, чтобы удалить СН2-домен и получить синтетический вектор, экспрессирующий константную область IgG₁ с удаленным доменом.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно настоящему изобретению представляют собой минитела. Минитела можно получить при помощи методов, описанных в данной области техники, см., например, патент США 5837821 или международную заявку WO 94/09817.

В одном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное согласно изобретению содержит тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую делецию или замену нескольких или даже одной аминокислоты, при условии, что она обеспечивает ассоциацию между мономерными субъединицами. Например, мутации одной аминокислоты в выбранных участках СН2-домена может быть достаточно, чтобы существенно снизить связывание Fc и тем самым повысить степень локализации тау. Аналогично, для модуляции может быть необходимо просто удалить ту часть одного или более доменов константной области, которая контролирует эффекторную функцию (например, связывание комплемента). Такие частичные делеции константных областей могут улучшить избранные характеристики антитела (сывороточное время полужизни), в то время как другие необходимые функции, связанные с данным доменом константной области, остаются незатронутыми. Кроме того, согласно вышесказанному, константные области описанных антител могут быть синтетическими вследствие мутации или замены одной или более аминокислот, которые усиливают профиль результирующей конструкции. В этом отношении может быть нарушена активность, обеспечиваемая консервативным связывающим участком (например, связывание Fc), но при этом в значительной степени сохраняются конфигурация и иммуногенный профиль модифицированного антитела. Другие варианты реализации изобретения включают добавление в константную область одной или более аминокислот, чтобы усилить желаемые характеристики, такие как эффекторная функция, или обеспечить большее присоединение цитотоксинов или углеводов. В таких вариантах реализации изобретения может быть желательно вставить или реплицировать определенные последовательности, полученные из выбранных доменов константной области.

В настоящем изобретении также предлагаются антитела, которые содержат, преимущественно состоят или состоят из вариантов (включая производные) молекул антител (например, V_H-областей и/или V_L-областей), описанных в данном документе, при этом антитела или их фрагменты иммуноспецифически связываются с тау. Для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, можно применять известные специалистам в данной области техники стандартные методы, включая, но не ограничиваясь этим, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые приводят к аминокислотным заменам. В одном варианте реализации изобретения варианты (включая производные) кодируют менее 50 аминокислотных замен, менее 40 аминокислотных замен, менее 30 аминокислотных замен, менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен или менее 2 аминокислотных замен по сравнению со стандартной V_H-областью, V_H-CDR1, V_H-CDR2, V_H-CDR3, V_L-областью, V_L-CDR1, V_L-CDR2 или V_L-CDR3. "Консервативной аминокислотной заменой" является такая, при которой аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь с таким же зарядом. Семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи с одинаковыми зарядами, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В альтернативном варианте можно в произвольном порядке вводить мутации на

протяжении всей или части кодирующей последовательности, например, при помощи насыщающего мутагенеза, и исследовать биологическую активность полученных в результате мутантов, чтобы выявить мутантов, которые сохраняют активность (например, способность связывать тау).

Например, мутации можно вводить только в каркасные области или только в CDR-области молекулы антитела. Введенные мутации могут быть молчащими или нейтральными миссенс-мутациями, т.е. не оказывать или оказывать незначительное влияние на способность антитела связывать антиген; в действительности некоторые такие мутации совсем не изменяют аминокислотную последовательность. Такие типы мутаций могут быть полезными для оптимизации частоты использования кодонов или улучшения выработки антител гибридами. Кодон-оптимизированные кодирующие области, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению, описаны в другом месте данного документа. В альтернативном варианте не являющиеся нейтральными миссенс-мутации могут изменять способность антитела связывать антиген. Большинство нейтральных и молчащих миссенс-мутаций с большой вероятностью располагаются в каркасных областях, в то время как большинство не являющихся нейтральными миссенс-мутаций с большой вероятностью располагаются в CDR, хотя это не является абсолютным требованием. Специалист в данной области техники способен сконструировать и исследовать мутантные молекулы с желаемыми свойствами, такими как отсутствие изменения антигенсвязывающей активности или изменение связывающей активности (например, улучшение антигенсвязывающей активности или изменение специфичности антитела). После мутагенеза можно легко экспрессировать кодируемый белок и определить функциональную и/или биологическую активность кодируемого белка (например, способность иммуноспецифически связывать по меньшей мере один эпитоп тау) при помощи описанных в данном документе методов или при помощи стандартных методов модификации, известных в данной области техники.

Характеристики тау-связывающих агентов, например, без ограничений, связывающих тау антител согласно настоящему изобретению, можно получить при помощи любых *in vivo* или *in vitro* моделей нейродегенеративных таупатий. Специалисту в данной области техники понятно, что характеристики тау-связывающего агента (например, антитела) согласно изобретению можно получить на мышинной модели нейродегенеративных таупатий. Например, без ограничений, любую из нижеприведенных разных животных моделей таупатий можно применять для получения характеристик и валидации антител к тау (и молекул, обладающих их специфичностью связывания) согласно настоящему изобретению.

1. Трансгенные ТауP301L мыши (линия 183): экспрессирующие человеческий Тау40 с мутацией P301L под управлением мышинного промотора Thy1.2 (получение этих трансгенных животных описано в Götz et al., J. Biol. Chem. 276 (2001), 529-534 и в международной заявке WO 2003/017918, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки).

2. JNPL3 мыши, экспрессирующие наиболее короткую изоформу человеческого тау 4R с мутацией P301L под управлением мышинного промотора PrP (доступны от Taconic, Hudson, NY, U.S.A.).

3. P301STau (линия PS19) мыши, экспрессирующие человеческий тау с мутацией P301S под управлением мышинного промотора PrP (доступны от Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A.).

Специалисту в данной области техники понятно, что экспериментальную модель нейродегенеративных таупатий можно применять в превентивных условиях или ее можно применять в терапевтических условиях. В превентивных условиях дозирование животных начинают до появления нейродегенеративных таупатий или их симптомов. В превентивных условиях связывающий тау агент (например, антитело) согласно изобретению оценивают в отношении его способности предотвращать, снижать или откладывать появление нейродегенеративных таупатий или их симптомов. В терапевтических условиях дозирование животных начинают после появления нейродегенеративных таупатий или их симптомов. В терапевтических условиях связывающий тау агент (например, антитело) согласно изобретению оценивают в отношении его способности лечить, уменьшать или облегчать нейродегенеративные таупатии или их симптомы. Симптомы нейродегенеративных таупатий включают, но не ограничиваются этим, накопление патологических отложений тау, нейрофибриллярные клубки (НФК), гиперфосфорилированный полипептид тау, нерастворимые фракции тау в нейронах, головном мозге, спинном мозге, цереброспинальной жидкости или сыворотке крови объекта эксперимента. Специалисту в данной области техники понятно, что положительный превентивный или терапевтический результат в любой животной модели нейродегенеративных таупатий свидетельствует о том, что конкретный связывающий тау агент (например, антитело) можно применять в превентивных или терапевтических целях в случае субъекта, отличного от экспериментального модельного организма, например, его можно применять для лечения нейродегенеративных таупатий у нуждающегося в этом человеческого субъекта.

В одном варианте реализации изобретения связывающий тау агент (например, антитело) согласно изобретению можно вводить мышам из мышинной модели таупатии и соответствующим контрольным мышам дикого типа. Вводимое антитело может представлять собой мураинизированное антитело согласно настоящему изобретению или человеческо-мышинное химерное антитело согласно настоящему изобретению. Связывающий тау агент (например, антитело) согласно изобретению можно вводить любыми известными в данной области техники путями, например путем внутривенного, внутримышечного, внутримышечного, внутривенного, подкожного, перорального и аэрозольного введения. Эксперимен-

тальные животные могут получать одну, две, три, четыре, пять или более доз связывающего тау агента (например, антитела) или контрольной композиции, такой как ФСБ. В одном варианте реализации изобретения экспериментальным животным вводят одну или две дозы связывающего тау агента (например, антитела); см., например, пример 9. В другом варианте реализации изобретения животных долговременно дозируют связывающим тау агентом (например, антителом) на протяжении нескольких недель или месяцев; см., например, пример 10. Специалист в данной области техники может легко составить режим дозирования, который соответствует экспериментальным целям, например режим дозирования для изучения эффектов "острого" дозирования, режим дозирования для изучения эффектов долговременного дозирования, режим дозирования для изучения токсичности, режим дозирования для изучения превентивных и терапевтических эффектов. Наличие связывающего тау агента (например, антитела) в конкретных участках ткани экспериментальных животных, например, без ограничений, в сыворотке крови, крови, цереброспинальной жидкости, ткани головного мозга, можно установить хорошо известными в данной области техники способами; см., например, пример 9 и 10. В одном варианте реализации изобретения связывающий тау агент (например, антитело) согласно изобретению способен проникать через гематоэнцефалический барьер. Специалисту в данной области техники понятно, что путем корректировки дозы связывающего тау агента (например, антитела) и частоты дозирования можно поддерживать желаемую концентрацию связывающего тау агента (например, антитела) у экспериментальных животных. Любые эффекты связывающего тау агента (например, антитела) согласно настоящему изобретению в моделях таупатий можно оценить, сравнивая уровень, биохимические характеристики или распределение тау у обрабатываемых и контрольных животных. В одном примере нейрофибриллярные клубки (НФК) исследуют при помощи метода импрегнации серебром по Gallyas или иммуноокрашивания моноклональными мышинными антителами AT100 и AT180, которые распознают патологически фосфорилированный тау в НФК. Количество или частоту появления Gallyas-положительных нейронов и/или меченых AT100, AT180 нейронов в головном и спинном мозге обрабатываемых антителами мышей и контрольных животных можно определить, чтобы оценить эффект от лечения антителами. В одном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению способно снижать уровень, количество или концентрацию нейрофибриллярных клубков в головном или спинном мозге в животной модели. Антитело может снижать уровень, количество или концентрацию нейрофибриллярных клубков по меньшей мере на около 5, 10, 20, 30, 50, 70, 90% или более. В другом варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению способно снижать количество или частоту появления Gallyas-положительных нейронов в головном или спинном мозге в животной модели, например, по меньшей мере на около 5, 10, 20, 30, 50, 70, 90% или более. В дополнительном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению способно снижать количество или частоту появления положительных в отношении антитела AT100 или AT180 нейронов в головном или спинном мозге в животной модели, например, по меньшей мере на около 5, 10, 20, 30, 50, 70, 90% или более. Эффект от антитела согласно настоящему изобретению также можно оценить, исследуя распределение и биохимические свойства тау после введения антитела. В одном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению способно снижать количество или концентрацию белка тау в головном или спинном мозге в животной модели, например, по меньшей мере на около 5, 10, 20, 30, 50, 70, 90% или более. В другом варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению способно снижать количество или концентрацию нерастворимого белка тау в головном или спинном мозге в животной модели, например, по меньшей мере на около 5, 10, 20, 30, 50, 70, 90% или более. Нерастворимую фракцию тау можно получить так, как описано, например, в примере 10 или в Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. *Neuron* 8,159(1992). Количество белка тау в биологическом образце можно определить любым способом, известным специалисту, например так, как описано в примере 10. В дополнительном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению способно снижать количество или концентрацию гиперфосфорилированного белка тау в головном или спинном мозге в животной модели, например, по меньшей мере на около 5, 10, 20, 30, 50, 70, 90% или более. Гиперфосфорилированный тау можно выявить, используя антитела, специфические к гиперфосфорилированным формам тау, такие как AT100 или AT180. Антитело согласно настоящему изобретению может также изменять, например снижать или повышать, концентрацию тау в крови, сыворотке крови или цереброспинальной жидкости в животной модели, например, по меньшей мере на около 5, 10, 20, 30, 50, 70, 90% или более. В одном варианте реализации изобретения % снижения или повышения определяют относительно уровня, числа, частоты появления, количества или концентрации до обработки, или относительно уровня, числа, частоты появления, количества или концентрации у необрабатываемого/контрольно обрабатываемого субъекта.

В одном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению может предотвращать или откладывать появление по меньшей мере одного симптома нейродегенеративной таупатии у субъекта. В одном варианте реализации изобретения антитело согласно настоящему изобретению может уменьшать или устранять по меньшей мере один симптом нейродегенеративной таупатии у субъекта. Указанным симптомом может быть образование патологических отложений тау, гиперфосфорилированных отложений тау, нерастворимых отложений тау, нейрофибриллярных волокон, нейрофибрил-

лярных волокон, предваряющих образование клубков фосфорных агрегатов тау, интранейрональных нейрофибриллярных клубков или экстранейрональных нейрофибриллярных клубков в головном или спинном мозге субъекта; см., например, Augustinack et al., *Acta Neuropathol* 103:26-35 (2002). Указанным симптомом также может быть присутствие или повышенная концентрация или количество тау в сыворотке крови, крови, моче или цереброспинальной жидкости, при этом повышенную концентрацию или количество сравнивают со здоровым субъектом. Указанным симптомом может быть неврологический симптом, например изменение условно-рефлекторного отвращения к пище, изменение контекстуального условно-рефлекторного замирания, нарушение памяти, утрата двигательной функции. В одном варианте реализации изобретения нарушение памяти исследуют при помощи задачи с прохождением Y-лабиринта с двумя испытаниями. В определенном варианте реализации изобретения задачу с прохождением Y-лабиринта с двумя испытаниями реализуют практически так, как описано в примере 10. В одном варианте реализации изобретения происходит снижение по меньшей мере одного симптома по меньшей мере на около 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70 или 90%. В другом варианте реализации изобретения показатель при прохождении Y-лабиринта с двумя испытаниями существенно выше у обрабатываемого антителом субъекта, чем у контрольного субъекта. В определенном варианте реализации изобретения показатель при прохождении Y-лабиринта с двумя испытаниями повышается по меньшей мере на около 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%. В другом варианте реализации изобретения показатель при прохождении Y-лабиринта с двумя испытаниями выше по меньшей мере приблизительно в два раза, три раза, четыре раза, пять раз, десять раз или двадцать раз. В настоящем изобретении также предлагается способ предотвращения или отсрочки по меньшей мере одного симптома нейродегенеративной таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества описанного в данном документе антитела к тау. В настоящем изобретении дополнительно предлагается способ снижения или устранения как минимум одного симптома нейродегенеративной таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества описанного в данном документе антитела к тау. В одном варианте реализации изобретения субъект представляет собой экспериментальный организм, такой как, без ограничений, трансгенная мышь. В одном варианте реализации изобретения субъект представляет собой человека.

III. Полинуклеотиды, кодирующие антитело.

Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может состоять из любого полирибонуклеотида или полидезоксирибонуклеотида, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. Например, полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может состоять из одно- и двухцепочечной ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечной РНК, РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, гибридных молекул, содержащих ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, чаще, двухцепочечными или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, может состоять из трехцепочечных областей, содержащих РНК или ДНК либо и РНК и ДНК. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, также может содержать одно или более модифицированных оснований или ДНК- или РНК-скелетов, модифицированных для стабильности или в других целях. "Модифицированные" основания включают, например, тритилированные основания и нестандартные основания, такие как инозин. В отношении ДНК и РНК можно осуществлять большое количество модификаций; таким образом, "полинуклеотид" включает в себя химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы.

Выделенный полинуклеотид, кодирующий неприродный вариант полипептида, полученного из иммуноглобулина (например, части тяжелой цепи или части легкой цепи иммуноглобулина), можно получить путем внесения в нуклеотидную последовательность иммуноглобулина одной или более нуклеотидных замен, добавок или делеций таким образом, чтобы в кодируемый белок были внесены одна или более аминокислотных замен, добавок или делеций. Мутации можно вводить при помощи стандартных методов, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. В одном варианте реализации изобретения проводят консервативные аминокислотные замены в одном или более заменимых аминокислотных остатков.

Как хорошо известно, РНК можно выделить из оригинальных В-клеток, гибридомных клеток или других трансформированных клеток при помощи стандартных методов, таких как экстракция гуанидинизотиоцианатом и преципитация с последующим центрифугированием или хроматографией. При желании мРНК можно выделить из общей РНК при помощи стандартных методов, таких как хроматография на олиго(dT)-целлюлозе. Подходящие методы известны в данной области техники. В одном варианте реализации изобретения кДНК, которые кодируют легкую и тяжелую цепи антитела, можно получить одновременно или отдельно, используя обратную транскриптазу и ДНК-полимеразу в соответствии с хорошо известными методами. ПЦР можно инициировать консенсусными праймерами константной области или более специфическими праймерами на основе известных ДНК тяжелой и легкой цепей и аминокислотных последовательностей. Как обсуждалось выше, ПЦР можно применять для выделения кло-

нов ДНК, кодирующих легкую и тяжелую цепи антитела. В этом случае можно проводить скрининг библиотек по консенсусным праймерам или более крупным гомологичным зондам, таким как зонды человеческой константной области.

ДНК, как правило плазмидную ДНК, можно выделить из клеток при помощи известных в данной области техники методов, проводя рестрикционное картирование и секвенирование в соответствии со стандартными, хорошо известными методами, подробно описанными, например, в нижеприведенных ссылках и относящимися к технологии рекомбинантных ДНК. Конечно, ДНК может быть синтетической в соответствии с настоящим изобретением на любом этапе во время процесса выделения или последующего анализа.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей варируемую область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), при этом по меньшей мере одна из CDR варируемой области тяжелой цепи или по меньшей мере две из V_H -CDR варируемой области тяжелой цепи являются по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными аминокислотным последовательностям V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 стандартной тяжелой цепи, полученным из антител, описанных в данном документе. В альтернативном варианте области V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 V_H являются по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными аминокислотным последовательностям V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3 стандартной тяжелой цепи, полученным из антител, описанных в данном документе. Таким образом, согласно этому варианту реализации изобретения варируемая область тяжелой цепи имеет полипептидные последовательности V_H -CDR1, V_H -CDR2 или V_H -CDR3, родственные полипептидным последовательностям, приведенным на фиг. 7. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной V_H CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 или 163; аминокислотная последовательность стандартной V_H CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 или 164; и аминокислотная последовательность стандартной V_H CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 или 165.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей варируемую область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), в которой области V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 имеют полипептидные последовательности, идентичные группам V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, приведенным на фиг. 7, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислотных замен в любой из V_H -CDR. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотные замены являются консервативными. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность V_H CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 или 163; аминокислотная последовательность V_H CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 или 164; и аминокислотная последовательность V_H CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 или 165.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей варируемую область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), при этом по меньшей мере одна из V_L -CDR варируемой области легкой цепи или по меньшей мере две из V_L -CDR варируемой области легкой цепи являются по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными аминокислотным последовательностям V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3 стандартной легкой цепи, полученным из антител, описанных в данном документе. В альтернативном варианте области V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3 V_L являются по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными аминокислотным последовательностям V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3 стандартной легкой цепи, полученным из антител, описанных в данном документе. Таким образом, согласно этому варианту реализации изобретения варируемая область легкой цепи имеет полипептидные последовательности V_L -CDR1, V_L -CDR2 или V_L -CDR3, родственные полипептидным последовательностям, приведенным на фиг. 7. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной V_L CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 или 224; аминокислотная последовательность стандартной V_L CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 или 167; и аминокислотная последовательность стандартной V_L CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 или 168.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей варируемую область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), в которой области V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 имеют полипептидные последовательности, идентичные группам V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, приведенным на фиг. 7, за исключением одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислотных замен в любой из V_L -CDR. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотные замены являются консервативными. В одном варианте реализации изобретения аминокис-

лотная последовательность стандартной VL CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 или 224; аминокислотная последовательность стандартной VL CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 или 167; и аминокислотная последовательность стандартной VL CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 или 168.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), в которой области V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3 имеют полипептидные последовательности, идентичные группам V_H -CDR1, V_H -CDR2 и V_H -CDR3, приведенным на фиг. 7. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность V_H CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 или 163; аминокислотная последовательность V_H CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 или 164; и аминокислотная последовательность V_H CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 или 165.

В другом варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), в которой области V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3 имеют полипептидные последовательности, идентичные группам V_L -CDR1, V_L -CDR2 и V_L -CDR3, приведенным на фиг. 7. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной V_L CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 или 224; аминокислотная последовательность стандартной V_L CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 или 167; и аминокислотная последовательность стандартной V_L CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 или 168.

Как известно в данной области техники, "идентичность последовательностей" между двумя полипептидами или двумя полинуклеотидами определяют, сравнивая аминокислотную или нуклеотидную последовательность одного полипептида или полинуклеотида с последовательностью второго полипептида или полинуклеотида. При обсуждении в данном документе, определение того, является ли любой конкретный полипептид по меньшей мере на около 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичным другому полипептиду, можно проводить при помощи методов и компьютерных программ/программного обеспечения, известных в данной области техники, таких как, без ограничений, программа BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). В BESTFIT используется алгоритм локальной гомологии Смита и Уотермана, *Advances in Applied Mathematics* 2(1981), 482-489, для того, чтобы находить сегмент с наилучшей гомологией между двумя последовательностями. При использовании BESTFIT или любой другой программы выравнивания последовательностей для определения того, является ли конкретная последовательность, например, на 95% идентичной стандартной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, параметры устанавливают, конечно, таким образом, чтобы рассчитать процент идентичности на протяжении полной длины стандартной полипептидной последовательности и чтобы разрешить гэпы в гомологии, составляющие до 5% от общего числа аминокислот в стандартной последовательности.

В одном варианте реализации настоящего изобретения полинуклеотид содержит, преимущественно состоит или состоит из нуклеиновой кислоты, имеющей полинуклеотидную последовательность V_H - или V_L -области анти-гау антитела, приведенную в табл. 4. В этом отношении специалисту в данной области техники понятно, что полинуклеотиды, кодирующие по меньшей мере вариабельный домен легкой и/или тяжелой цепи, могут кодировать вариабельный домен обеих цепей иммуноглобулина или только одной.

Таблица 4

Нуклеотидные последовательности V_H - или V_L -области
гау-специфических антител. ДГ - до гуманизирования

Антитело	Нуклеотидные последовательности вариабельной тяжелой (VH) и вариабельной легкой (VL) цепей	
NI-105.17C1	ДГ V_H	SEQ. ID. NO:169

	V _H	SEQ. ID. NO:170
	V _L	SEQ. ID. NO:171
NI-105.6C5	ДГ V _H	SEQ. ID. NO:172
	V _H	SEQ. ID. NO:173
	V _L	SEQ. ID. NO:174
NI-105.29G10	V _H	SEQ. ID. NO:175
	V _L	SEQ. ID. NO:176
NI-105.6L9	V _H	SEQ. ID. NO:177
	V _L	SEQ. ID. NO:178
NI-105.40E8	V _H	SEQ. ID. NO:179
	V _L	SEQ. ID. NO:180
NI-105.48E5	V _H	SEQ. ID. NO:181
	V _L	SEQ. ID. NO:182
NI-105.6E3	V _H	SEQ. ID. NO:183
	V _L	SEQ. ID. NO:184
NI-105.22E1	V _H	SEQ. ID. NO:185
	V _L	SEQ. ID. NO:186
NI-105.26B12	V _H	SEQ. ID. NO:187
	ДГ V _L	SEQ. ID. NO:188
	V _L	SEQ. ID. NO:223
NI-105.12E12	V _H	SEQ. ID. NO:189
	V _L	SEQ. ID. NO:190
NI-105.60E7	V _H	SEQ. ID. NO:191
	V _L	SEQ. ID. NO:192
NI-105.14E2	V _H	SEQ. ID. NO:193
	V _L	SEQ. ID. NO:194
NI-105.39E2	V _H	SEQ. ID. NO:195
	V _L	SEQ. ID. NO:196
NI-105.19C6	V _H	SEQ. ID. NO:197
	V _L	SEQ. ID. NO:198
NI-105.9C4	ДГ V _H	SEQ. ID. NO:199
	V _H	SEQ. ID. NO:200
	ДГ V _L	SEQ. ID. NO:201
	V _L	SEQ. ID. NO:202

В одном варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариативную область тяжелой цепи иммуноглобулина, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 95% идентичную стандартной V_H тяжелой цепи. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной вариативной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76 или 220.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, содержащий, преимущественно состоящий или состоящий из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариативную область легкой цепи иммуноглобулина, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 95% идентичную стандартной V_L легкой цепи. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность стандартной вариативной области легкой цепи содержит SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221 или 222.

Настоящее изобретение также включает фрагменты полинуклеотидов согласно изобретению, описанные в другом месте. Кроме того, полинуклеотиды, которые кодируют слитые полипептиды, Fab-фрагменты и другие производные, описанные в данном документе, также предусмотрены в изобретении.

Полинуклеотиды могут быть получены или произведены любым известным в данной области техники способом. Например, если известна нуклеотидная последовательность антитела, полинуклеотид, кодирующий антитело, можно собрать из химически синтезированных олигонуклеотидов, например, способом, описанным в Kutmeier et al., *BioTechniques* 17 (1994), 242, который, вкратце, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование этих олигонуклеотидов и затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов ПЦР.

В альтернативном варианте полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника. Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, недоступен, но известна последовательность молекулы антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно химически синтезировать или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител или библиотеки кДНК, полученной из, или нуклеиновой кислоты, предпочтительно полиА⁺РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих тау-специфическое антитело, таких как клетки гибридомы, селектированные для экспрессии антитела) при помощи ПЦР-амплификации с применением синтетических праймеров, гибридизируемых с 3'- и 5'-концами последовательности, или при помощи клонирования с применением олигонуклеотидного зонда, специфического в отношении конкретной генной последовательности для определения, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, который кодирует антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные при помощи ПЦР, затем можно клонировать в реплицируемые клонирующие векторы любым хорошо известным в данной области техники способом.

После определения нуклеотидной последовательности и соответствующей аминокислотной последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного с его нуклеотидной последовательностью можно производить манипуляции при помощи методов, хорошо известных в данной области техники для манипуляции с нуклеотидными последовательностями, например технологии рекомбинантных ДНК, сайт-направленного мутагенеза, ПЦР и т.д. (см., например, методы, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) и Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998), которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки), для получения антител, имеющих разную аминокислотную последовательность, например, для введения аминокислотных замен, делеций и/или инсерций.

IV. Экспрессия полипептидов антител.

После манипуляций с выделенным генетическим материалом для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно изобретению полинуклеотиды, кодирующие антитела, как правило, вставляют в экспрессионный вектор для внесения в клетки-хозяева, которые можно использовать для получения желаемого качества антитела. Рекомбинантная экспрессия антитела или его фрагмента, производного или аналога, например, тяжелой или легкой цепи антитела, которое связывается с молекулой-мишенью, описана в данном документе. После получения полинуклеотида, кодирующего молекулу антитела либо тяжелую или легкую цепь антитела, или его часть (предпочтительно содержащую вариабельный домен тяжелой или легкой цепи) согласно изобретению, вектор для получения молекулы антитела можно получить при помощи технологии рекомбинантных ДНК, используя методы, хорошо известные в данной области техники. Таким образом, способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, описаны в данном документе. Хорошо известные специалисту в данной области техники способы можно применять для конструирования экспрессионных векторов, содержащих последовательности, кодирующие антитело, и соответствующие транскрипционные и трансляционные контрольные сигналы. Эти способы включают, например, *in vitro* технологии рекомбинантных ДНК, синтетические технологии и *in vivo* генетическую рекомбинацию. Таким образом, в изобретении предлагаются реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела согласно изобретению или ее тяжелую или легкую цепь, или вариабельный домен тяжелой или легкой цепи, функционально связанный с промотором. Такие векторы могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, международные заявки WO 86/05807 и WO 89/01036; а также патент США № 5122464), а вариабельный домен антитела можно клонировать в такой вектор для экспрессии полной тяжелой или легкой цепи. Употребляемый в данном документе термин "вектор" или "экспрессионный вектор" означает векторы, используемые в соответствии с настоящим изобретением в качестве носителя для внесения в клетку-хозяина и экспрессии в ней желаемого гена. Как известно специалистам в данной области техники, такие векторы легко можно выбрать из группы, состоящей из плазмид, фагов, вирусов и ретровирусов. В целом, векторы, подходящие для данного изобретения, будут содержать селектируемый маркер, подходящие рестрикционные участки для облегчения клонирования желаемого гена и способности проникать и/или реплицироваться в эукариотических или прокариотических клетках. В целях данного изобретения можно применять многочисленные экспрессионные векторные системы. Например, в одном классе векторов используются ДНК-элементы, которые получены из

вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус осповакцины, бакуловир, ретровирусы (PCV, BOMJM или BMLM) или вирус SV40. В других используются полицистронные системы с внутренними участками связывания рибосом. Кроме того, можно проводить селекцию клеток, в хромосомы которых была интегрирована ДНК, путем внесения одного или более маркеров, которые создают возможность селекции трансфицированных клеток-хозяев. Маркер может обеспечивать прототрофность ауксотрофного хозяина, устойчивость к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Ген селектируемого маркера можно непосредственно присоединять к последовательностям ДНК, предназначенным для экспрессии, или вносить в ту же самую клетку путем котрансформации. Для оптимального синтеза мРНК могут понадобиться дополнительные элементы. Эти элементы могут включать сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, а также транскрипционные промоторы, энхансеры и сигналы терминации.

В конкретных вариантах реализации изобретения клонированные гены варибельной области вставляют в экспрессионный вектор вместе с генами константной области тяжелой и легкой цепи (например, гены человеческой константной области тяжелой и легкой цепи), как обсуждалось выше. В одном варианте реализации изобретения это осуществляют при помощи запатентованного экспрессионного вектора от Biogen IDEC, Inc., под названием NEOSPLA, описанного в патенте США № 6159730. Этот вектор содержит промотор/энхансер цитомегаловируса, основной промотор мышинового бета-глобина, точку начала репликации SV40, последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста, экзон 1 и экзон 2 неомизина фосфотрансферазы, ген дигидрофолатредуктазы и лидерную последовательность. Было обнаружено, что этот вектор приводит к очень высокому уровню экспрессии антител после инкорпорации генов варибельной и константной области, трансфекции в клетки CHO с последующей селекцией в G418-содержащей среде и амплификации под действием метотрексата. Конечно, в настоящем изобретении можно применять любой вектор, способный приводить к экспрессии в эукариотических клетках. Примеры подходящих векторов включают, но не ограничиваются этим, плазмиды pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 и pZeoSV2 (доступные от Invitrogen, San Diego, CA), и плазмиду pCI (доступную от Promega, Madison, WI). В целом скрининг большого количества трансформированных клеток в отношении тех, которые экспрессируют тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина на подходящем высоком уровне, является стандартным экспериментом, который можно проводить, например, при помощи автоматизированных систем. Векторные системы также описаны в патентах США № 5736137 и № 5658570, каждый из которых в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Эта система обеспечивает высокие уровни экспрессии, например > 30 пг/клетку/день. Другие типовые векторные системы раскрыты, например, в патенте США № 6413777.

В других вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению можно экспрессировать при помощи полицистронных конструкций, таких как описанные в опубликованной патентной заявке США № 2003-0157641 A1, в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки. В этих экспрессионных системах из одной полицистронной конструкции можно получить множественные представляющие интерес генные продукты, такие как тяжелые и легкие цепи антител. В этих системах преимущественно используется участок внутренней посадки рибосомы (УВР), чтобы обеспечить относительно высокие уровни антител. Подходящие последовательности УВР раскрыты в патенте США № 6193980, который также включен в данный документ. Специалистам в данной области техники понятно, что такие экспрессионные системы можно применять для эффективного получения всего диапазона антител, описанных в настоящей заявке.

В более общем смысле, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующей мономерную субъединицу антитела, экспрессионный вектор можно вносить в подходящую клетку-хозяина. Внесение плазмиды в клетку-хозяина можно осуществлять разными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Они включают, но не ограничиваются этим, трансфекцию, включая липотрансфекцию с применением, например, Fugene® или липофектамина, слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция, клеточное слияние с оболочечной ДНК, микроинъекцию и инфицирование интактным вирусом. Как правило, внесение плазмиды в хозяина осуществляют стандартным способом совместного осаждения с фосфатом кальция. Клетки-хозяева, содержащие экспрессионную конструкцию, выращивают в условиях, подходящих для выработки легких цепей и тяжелых цепей, и проводят анализ синтеза белка тяжелой и/или легкой цепи. Типовые методы анализа включают ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) или сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), иммуногистохимию и тому подобное.

Экспрессионный вектор переносят в клетку-хозяина при помощи стандартных методов, а трансфицированные клетки затем культивируют при помощи стандартных методов для получения антитела для применения в описанных в данном документе способах. Таким образом, изобретение включает в себя клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело согласно изобретению или его тяжелую или легкую цепь, функционально связанный с гетерологичным промотором. В конкретных вариантах реализации изобретения для экспрессии двухцепочечных антител в клетке-хозяине можно коэкспрес-

сировать векторы, кодирующие обе цепи - тяжелую и легкую, для экспрессии полной молекулы иммуноглобулина, как подробно описано ниже.

Клетку-хозяин можно котрансфицировать двумя экспрессионными векторами согласно изобретению, при этом первый вектор кодирует полипептид, полученный из тяжелой цепи, а второй вектор кодирует полипептид, полученный из легкой цепи. Оба вектора могут содержать идентичные селективируемые маркеры, что обеспечивает возможность одинаковой экспрессии полипептидов тяжелой и легкой цепи. В альтернативном варианте можно применять единичный вектор, который кодирует оба полипептида - тяжелой и легкой цепи. В таких ситуациях предпочтительно размещать легкую цепь перед тяжелой цепью, чтобы не допустить избытка токсичной свободной тяжелой цепи; см. Proudfoot, *Nature* 322 (1986), 52; Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(1980), 2197. Кодирующие последовательности тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

Употребляемое в данном документе выражение "клетки-хозяева" относится к клеткам, которые содержат векторы, сконструированные при помощи технологии рекомбинантных ДНК и кодирующие по меньшей мере один гетерологичный ген. При описании способов выделения антител из рекомбинантных хозяев термины "клетка" и "клеточная культура" используются взаимозаменяемо для обозначения источника антител, если четко не указано иное. Другими словами, восстановление полипептида из "клеток" может означать как получение после центрифугирования цельных клеток, так и клеточной культуры, содержащей среду и суспендированные клетки.

Для экспрессии молекул антител для применения в способах, описанных в данном документе, можно использовать большое количество разных систем хозяин-экспрессионный вектор. Такие системы хозяин-экспрессионный вектор представляют собой носители, при помощи которых можно получить и впоследствии очистить представляющие интерес кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфекции подходящими нуклеотидными кодирующими последовательностями могут экспрессировать молекулу антитела согласно изобретению *in situ*. Они включают, но не ограничиваются этим, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*, *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантными экспрессионными векторами, содержащими ДНК бактериофагов, плазмидную ДНК или космидную ДНК, содержащую кодирующие антитело последовательности; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессионными векторами, содержащими кодирующие антитело последовательности; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирусы), содержащими кодирующие антитело последовательности; системы клеток растений, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, вируса мозаики цветной капусты, ВМЦК; вируса табачной мозаики, ВТМ) или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессионными векторами (например, Ti-плазмидными), содержащими кодирующие антитело последовательности; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3), содержащие рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотронеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса осповакцины 7.5K). В одном варианте реализации изобретения для экспрессии рекомбинантной молекулы антитела применяют бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, и, более предпочтительно, эукариотические клетки, в особенности для экспрессии полной рекомбинантной молекулы антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичников китайского хомяка (CHO), в сочетании с вектором, таким как промоторный элемент основного немедленно раннего гена человеческого цитомегаловируса, представляют собой эффективную экспрессионную систему для антител; см., например, Foecking et al., *Gene* 45 (1986), 101; Cockett et al., *Bio/Technology* 8 (1990), 2.

Линия клеток-хозяев, применяемая для экспрессии белков, часто имеет млекопитающее происхождение; специалисты в данной области техники способны определить конкретные линии клеток-хозяев, которые наиболее подходят для экспрессии в них желаемого генного продукта. Типовые линии клеток-хозяев включают, но не ограничиваются этим, CHO (яичники китайского хомяка), DG44 и DUXB11 (линии яичников китайского хомяка, ДГФР минус), HELA (карцинома шейки матки человека), CV1 (линия почек обезьяны), COS (производное CV1 с антигеном SV40 T), VERY, ВНК (почки новорожденного хомяка), MDCK, W138, R1610 (фибробласты китайского хомяка), BALBC/3T3 (мышинные фибробласты), НАК (линия почек хомяка), SP2/O (мышинная миелома), P3x63-Ag3.653 (мышинная миелома), BFA-1c1BPT (бычьи эндотелиальные клетки), RAJ1 (лимфоциты человека) и 293 (почки человека). В конкретном варианте реализации изобретения линии клеток-хозяев представляют собой клетки CHO или 293. Линии клеток-хозяев, как правило, доступны из коммерческих источников, Американской коллекции тканевых культур или из опубликованной литературы.

Кроме того, можно выбрать штамм клеток-хозяев, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и процессирует генный продукт определенным желаемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функции белка. Разные клетки-хозяева имеют характерные и специфичные механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов.

Можно подобрать подходящие клеточные линии или хозяйские системы, чтобы гарантировать правильные модификацию и процессинг экспрессируемого чужеродного белка. Для этой цели можно применять эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта.

Для долгосрочной высокоэффективной выработки рекомбинантных белков предпочтительно наличие стабильной экспрессии. Например, можно сконструировать клеточные линии, которые стабильно экспрессируют молекулу антитела. Вместо применения экспрессионных векторов, которые содержат вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева можно трансформировать ДНК под управлением соответствующих контрольных элементов экспрессии (например, промотора, энхансера, последовательностей, терминаторов транскрипции, участков полиаденилирования и т.д.) и селективируемым маркером. После внесения чужеродной ДНК полученные клетки можно выращивать на протяжении 1-2 дней в обогащенных средах, а затем перенести в селективные среды. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде обеспечивает устойчивость к селекции и создает возможность стабильной интеграции плазмиды в хромосомы клеток и их роста до образования центров, которые в свою очередь можно клонировать и расширять в клеточные линии. Этот способ можно применять преимущественно для создания клеточных линий, которые стабильно экспрессируют молекулу антитела.

Можно применять большое количество систем селекции, включая, но не ограничиваясь этим, возможность применения генов тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., Cell 11 (1977), 223), гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48(1992), 202) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., Cell 22 (1980), 817) соответственно в tk-, hgprrt- или aprt-клетках. Также можно использовать устойчивость к антиметаболитам как основу для селекции следующих генов: dhfr, который обеспечивает устойчивость к метотрексату (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527); gpt, который обеспечивает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); neo, который обеспечивает устойчивость к аминогликозиду G-418 Goldspiel et al., Clinical Pharmacology 12 (1993), 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32(1993), 573-596; Mulligan, Science 260(1993), 926-932; и Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62(1993), 191-217; TIB TECH 11(1993), 155-215; и hygro, который обеспечивает устойчивость к гигромицину (Santerre et al., Gene 30(1984), 147). Способы, общеизвестные в области техники рекомбинантных ДНК, которые можно применять, описаны в Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); и в главах 12 и 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981), которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Уровни экспрессии молекулы антитела можно повысить посредством амплификации вектора, см. обзор Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987). Когда маркер в экспрессирующей антитело векторной системе является амплифицируемым, повышение уровня присутствующего в культуре клеток-хозяев ингибитора приведет к увеличению числа копий маркерного гена. Так как амплифицируемая область ассоциирована с геном антитела, выработка антител также повысится; см. Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257.

In vitro выработка обеспечивает возможность расширения масштаба для получения больших количеств желаемых полипептидов. Способы культивирования клеток млекопитающих в условиях тканевого культивирования известны в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в эрлифтном реакторе или в реакторе с постоянным перемешиванием, или иммобилизованную или инкапсулированную клеточную культуру, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на арагозных микрогранулах или керамических картриджах. При необходимости и/или желании растворы полипептидов можно очищать традиционными хроматографическими методами, например геле-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе или (иммуно-)аффинной хроматографией, например, после избирательного биосинтеза синтетического полипептида шарнирной области или до или после описанного в данном документе этапа хроматографии с гидрофобным взаимодействием.

Также гены, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению, можно экспрессировать в клетках, не являющихся клетками млекопитающих, таких как клетки бактерий, или насекомых, или дрожжей, или растений. Бактерии, которые легко поглощают нуклеиновые кислоты, включают представителей энтеробактерий, таких как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; бацилл, таких как *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* и *Haemophilus influenzae*. Кроме того, следует понимать, что в случае бактериальной экспрессии гетерологичные полипептиды, как правило, становятся частью телец включения. Гетерологичные полипептиды необходимо выделять, очищать и затем собирать в функциональные молекулы. В случае если желаемой формой антитела является четырехвалентная, происходит самосборка субъединиц в четырехвалентные антитела; см., например, международную заявку WO02/096948.

В случае бактериальных систем можно с успехом выбрать большое количество экспрессионных векторов в зависимости от предназначения экспрессируемой молекулы антитела. Например, когда необходимо получить большое количество такого белка для создания фармацевтических композиций, содержащих молекулы антител, желательно получить векторы, которые приводят к экспрессии высоких уровней белковых продуктов слияния, которые легко очищать. Такие векторы включают, но не ограничиваются этим, экспрессионный вектор *E. coli* pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2 (1983), 1791), в котором кодирующую антитело последовательность можно отдельно лигировать в вектор в рамке с кодирующей областью *lacZ* таким образом, чтобы вырабатывался слитый белок; векторы pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509); и тому подобные. Также для экспрессии чужеродных полипептидов в виде белков слияния с глутатион-S-трансферазой (GST) можно применять векторы pGEX. Как правило, такие слитые белки растворимы и их можно легко очистить от лизированных клеток посредством адсорбции и связывания с матрицей глутатион-агарозных гранул с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Конструкция векторов pGEX подразумевает наличие сайтов расщепления тромбином или протеазой фактора Ха, чтобы могло происходить высвобождение клонированного целевого генного продукта из вещества GST.

Кроме прокариотов также можно применять эукариотические микробы. *Saccharomyces cerevisiae* или обычные пекарские дрожжи являются наиболее применимыми среди эукариотических микроорганизмов, хотя большое количество других штаммов также общедоступны, например *Pichia pastoris*. Для экспрессии в *Saccharomyces* обычно применяют, например, плазмиду YRp7 (Stinchcomb et al., Nature 282 (1979), 39; Kingsman et al., Gene 7(1979), 141; Tschemper et al., Gene 10(1980), 157). Эта плазмида изначально содержит ген TRP1, который является селективируемым маркером для мутантного штамма дрожжей, не способного к росту в триптофана, например ATCC № 44076 или PEP4-1 (Jones, Genetics 85(1977), 12). Такая характеристика генома дрожжевой клетки-хозяина, как наличие повреждения *trp1*, затем обеспечивает эффективную среду для выявления трансформации путем выращивания в отсутствие триптофана.

В насекомой системе в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов, как правило, применяют вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV). Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующую антитело последовательность можно отдельно клонировать во второстепенные области (например, гена полиэдрина) вируса и поместить под управление промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).

После рекомбинантной экспрессии молекулы антитела согласно изобретению полные антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи или другие формы иммуноглобулина согласно настоящему изобретению можно очищать в соответствии со стандартными в данной области техники процедурами, включая, например, хроматографию (например, ионообменную, аффинную, в частности аффинную в отношении специфического антигена с протеином А, и размерную колоночную хроматографию), центрифугирование, дифференциальную растворимость, например осаждение сульфатом аммония или любой другой стандартный метод очистки белков; см., например, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). В альтернативном варианте в патенте США 2002-0123057 A1 раскрыт другой способ повышения аффинности антител согласно изобретению.

V. Слитые белки и конъюгаты.

В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид антитела содержит аминокислотную последовательность или один или более компонентов, которые обычно не ассоциированы с антителом. Более подробно типовые модификации описаны ниже. Например, одноцепочечный Fv-фрагмент антитела согласно изобретению может содержать гибкую линкерную последовательность или может быть модифицирован так, чтобы содержать функциональный компонент (например, ПЭГ, лекарственное вещество, токсин или метку, например флуоресцентную, радиоактивную, ферментативную, ядерно-магнитную, тяжелый металл и тому подобное).

Полипептид антитела согласно изобретению может содержать, преимущественно состоять или состоять из слитого белка. Слитые белки представляют собой химерные молекулы, которые содержат, например, тау-связывающий домен иммуноглобулина с по меньшей мере одним участком связывания мишени и по меньшей мере одной гетерологичной частью, т.е. частью, с которой он не связан природным образом. Аминокислотные последовательности могут находиться в обычном состоянии в разных белках, которые соединены вместе в слитый белок, или они могут находиться в обычном состоянии в одном белке, но в слитом белке они размещены в новом порядке. Слитые белки можно создавать, например, путем химического синтеза или создавая и транслируя полинуклеотид, в котором пептидные области кодируются в желаемом взаиморасположении.

Применяемый в отношении полинуклеотида или полипептида термин "гетерологичный" означает, что полинуклеотид или полипептид получен из соединения, отличного от того, к которому относится остальное соединение, с которым его сравнивают. Например, в контексте данного документа "гетерологичный полипептид", предназначенный для слияния с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вариантом или аналогом, получен из не являющегося иммуноглобулином полипептида того же вида либо являющегося или не являющегося иммуноглобулином полипептида другого вида.

Как более подробно обсуждается в другом месте данного документа, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению могут быть дополнительно рекомбинантно слиты с гетерологичным полипептидом в N- или C-конце или химически конъюгированы (включая ковалентные и нековалентные конъюгации) с полипептидами или другими композициями. Например, антитела могут быть рекомбинантно слиты или конъюгированы с молекулами, применяемыми в качестве меток в методах выявления, и эффекторными молекулами, такими как гетерологичные полипептиды, лекарственные вещества, радионуклиды или токсины; см., например, международные заявки WO92/08495; WO91/14438; WO89/12624; патент США № 5314995 и Европейскую патентную заявку EP 0396387.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению могут состоять из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями или модифицированными пептидными связями, т.е. пептидными изостерами, и могут содержать аминокислоты, отличные от 20 кодируемых генами аминокислот. Антитела могут быть модифицированы в ходе природных процессов, таких как посттрансляционный процессинг, или посредством химических способов модификации, которые хорошо известны в данной области техники. Такие модификации хорошо описаны в общих пособиях и более подробных монографиях, а также в многочисленной научной литературе. Модификации могут происходить в любом месте антитела, включая пептидный скелет, аминокислотные боковые цепи и amino- или карбоксильные концы, или на таких компонентах, как углеводы. Следует понимать, что модификации одного типа могут присутствовать в той же или в разной степени в нескольких участках заданного антитела. Также заданное антитело может содержать много типов модификаций. Антитела могут быть разветвленными, например, в результате убиквитинирования и могут быть циклическими с или без разветвления. Циклические, разветвленные и циклические разветвленные антитела могут появляться в результате природных посттрансляционных процессов или могут быть созданы синтетическими способами. Модификации включают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гем-компонента, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное связывание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных перекрестных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование ГФИ-якоря, гидроксилирование, иодирование, метилирование, миристиолирование, окисление, пэгилирование, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селенирование, сульфатацию, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот в белки, такое как аргинилирование и убиквитинирование; см., например, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); *Post-translational Covalent Modification Of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182 (1990), 626-646; Rattan et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 663 (1992), 48-62).

В настоящем изобретении также предлагаются слитые белки, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное и гетерологичный полипептид. В одном варианте реализации изобретения слитый белок согласно изобретению содержит, преимущественно состоит или состоит из полипептида, имеющего аминокислотную последовательность одной или более из V_H -областей антитела согласно изобретению или аминокислотную последовательность одной или более из V_L -областей антитела согласно изобретению или его фрагментов или вариантов, и гетерологичную полипептидную последовательность. В другом варианте реализации изобретения слитый белок для применения в раскрытых в данном документе диагностических и лечебных способах содержит, преимущественно состоит или состоит из полипептида, имеющего аминокислотную последовательность одной, двух, трех из V_H -CDR антитела или его фрагментов, вариантов или производных, или аминокислотную последовательность одной, двух, трех из V_L -CDR антитела или его фрагментов, вариантов или производных, и гетерологичную полипептидную последовательность. В одном варианте реализации изобретения слитый белок содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность V_H -CDR3 антитела согласно настоящему изобретению или его фрагмента, варианта или производного, и гетерологичную полипептидную последовательность, при этом слитый белок специфически связывается с тау. В другом варианте реализации изобретения слитый белок содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере одной V_H -области антитела согласно изобретению и аминокислотную последовательность по меньшей мере одной V_L -области антитела согласно изобретению или его фрагментов, вариантов или производных, и гетерологичную полипептидную последовательность. В одном варианте реализации изобретения V_H - и V_L -области слитого белка соответствуют одному антителу (или scFv- или Fab-фрагменту), которое специфически связывает тау. В другом варианте реализации изобретения слитый белок для применения в раскрытых в данном документе диагностических и лечебных способах содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность одной, двух, трех или более из V_H CDR антитела и аминокислотную последовательность одной, двух, трех или более из V_L CDR антитела или его фрагментов или вариантов, и гетерологичную полипептидную последовательность. В одном ва-

рианте реализации изобретения две, три, четыре, пять, шесть или более из V_H -CDR или V_L -CDR соответствуют одному антителу (или scFv- или Fab-фрагменту) согласно изобретению. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие эти слитые белки, также включены в изобретение.

Типовые слитые белки описаны в литературе, включая продукты слияния рецептора Т-клеток (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon et al., Nature 337 (1989), 525-531; Traunecker et al., Nature 339 (1989), 68-70; Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA 9 (1990), 347-353 и Byrn et al., Nature 344 (1990), 667-670); L-селектина ("хоминг"-рецептора) (Watson et al., J. Cell. Biol. 110 (1990), 2221-2229; и Watson et al., Nature 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo et al., Cell 61 (1990), 1303-1313); CD28 и B7 (Linsley et al., J. Exp. Med. 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (Lisley et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66 (1991), 1133-1144); TNF-рецептора (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886 и Peppel et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 1483-1489 (1991); и рецептора IgE (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), Abstract No. 1448).

Как обсуждается в другом месте данного документа, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению могут быть слиты с гетерологичными полипептидами для повышения *in vivo* времени полужизни полипептидов для применения в методах иммуноанализа при помощи известных в данной области техники способов. Например, в одном варианте реализации изобретения к антителам согласно изобретению может быть конъюгирован ПЭГ для повышения их *in vivo* времени полужизни; см., например, Leong et al., Cytokine 16(2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531 или Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению могут быть слиты с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения их очистки или выявления. В конкретных вариантах реализации изобретения маркерная аминокислотная последовательность представляет собой пептид гексагистидина (HIS), например, такой как метка в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), многие такие метки коммерчески доступны. Как описано, например, в Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824, гексагистидин обеспечивает удобную очистку слитого белка. Другие пептидные метки, применимые для очистки, включают, но не ограничиваются этим, метку "НА", которая соответствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинина гриппа (Wilson et al., Cell 37 (1984), 767), и метку "flag".

Слитые белки можно получить при помощи хорошо известных в данной области техники способов; см., например, патенты США №№ 5116964 и 5225538. Конкретный участок, на котором проводится слияние, можно выбрать эмпирически для оптимизации секреции или связывающих характеристик слитого белка. Затем ДНК, кодирующую слитый белок, трансфицируют в клетку-хозяин для экспрессии.

Антитела согласно настоящему изобретению можно применять в неконъюгированной форме, или они могут быть конъюгированы по меньшей мере с одной из множества молекул, например, для улучшения терапевтических свойств молекулы, для облегчения выявления мишени или для визуализации или терапии пациента. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению можно метить или конъюгировать как до, так и после очистки, в случае проведения очистки. В частности, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению можно конъюгировать с терапевтическими агентами, пролекарственными формами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

Конъюгаты, являющиеся иммунотоксинами, включая традиционные антитела, широко описаны в данной области техники. Токсины можно сопрягать с антителами традиционными способами сопряжения, или иммунотоксины, содержащие белковые части токсинов, можно получать в виде слитых белков.

Антитела согласно настоящему изобретению можно применять соответствующим способом для получения таких иммунотоксинов. Такие токсины проиллюстрированы и описаны в Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 и в Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

Специалистам в данной области техники понятно, что конъюгаты можно получать разными способами в зависимости от выбранного для конъюгации агента. Например, конъюгаты с биотином получают, например, проводя реакцию между тау-связывающим полипептидом и активированным эфиром биотина, таким как N-гидроксисукцинимид эфир биотина. Аналогично, конъюгаты с флуоресцентным маркером можно получить в присутствии сопрягающего агента, например, из перечисленных в данном документе, или проводя реакцию с изотиоцианатом или флуоресцеинизотиоцианатом. Конъюгаты антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных согласно изобретению получают аналогичным образом.

В настоящее изобретение дополнительно включены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные согласно изобретению, конъюгированные с диагностическим или терапевтическим агентом. Антитела можно применять в диагностических целях, чтобы, например, продемонстрировать наличие неврологического заболевания, определить риск появления неврологического заболевания, отследить развитие или прогрессирование неврологического заболевания, т.е. таупатического заболевания, что является частью процедуры клинического исследования, чтобы, например, опре-

делить эффективность данного режима лечения и/или предотвращения. Выявление можно облегчить путем сопряжения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного с выявляемым веществом. Примеры выявляемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы, испускающие позитроны металлы, применяемые в разных видах позитронной эмиссионной томографии, и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов; см., например, патент США № 4741900, в отношении ионов металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в качестве диагностических средств в соответствии с настоящим изобретением. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного материала включает люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин; и примеры подходящих радиоактивных материалов включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In или ^{99}Tc .

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное также можно снабдить выявляемой меткой путем сопряжения с хемилюминесцентным соединением. Затем наличие хемилюминесцентно меченого антитела определяют, выявляя наличие люминесценции, которая возникает в ходе химической реакции. Примерами особенно удобных хемилюминесцентных метящих соединений являются люминол, изолюминол, ароматический эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и оксалат.

Один из способов, которым антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное можно снабдить выявляемой меткой, состоит в связывании его с ферментом и применении к связанному продукту метода иммуноферментного анализа (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2(1978), 1-7); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kogaku Shoin, Tokyo (1981). Фермент, который связан с антителом, будет реагировать с соответствующим субстратом, предпочтительно хромогенным субстратом, таким образом, чтобы вырабатывать химическое вещество, которое можно выявить при помощи, например, спектрофотометрии, флуорометрии или при помощи визуализирующих средств. Ферменты, которые можно применять для выявления меченного антитела, включают, но не ограничиваются этим, малатдегидрогеназу, стафилококковую нуклеазу, дельта-5-стероидную изомеразу, дрожжевую алкогольдегидрогеназу, альфа-глицерофосфат, дегидрогеназу, триозофосфатизомеразу, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, аспарагиназу, глюкозоксидазу, бета-галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетилхолинэстеразу. Кроме того, выявление можно осуществлять колориметрическими методами, в которых применяется хромогенный субстрат для фермента. Выявление также можно осуществлять путем визуального сравнения степени ферментативной реакции субстрата и аналогично приготовленных стандартных образцов.

Выявление также можно осуществлять при помощи любого из множества методов иммуноанализа. Например, путем внесения в антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное радиоактивной метки можно выявлять антитело при помощи радиоиммуноанализа (RIA) (см., например, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986)), которая включена в данный документ посредством ссылки). Радиоактивный изотоп можно выявить при помощи, без ограничений, счетчика гамма-частиц, сцинтилляционного счетчика или ауторадиографии.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное также можно снабдить выявляемой меткой, используя флуоресцентные металлы, такие как ^{152}Eu или другие металлы группы лантанидов. Эти металлы можно присоединить к антителу при помощи таких металл-хелатирующих групп, как диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПУ) или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТУ).

Методы конъюгации различных компонентов с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вариантом или производным хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press p. 303-16 (1985), и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62(1982), 119-158.

Как говорилось ранее, в некоторых вариантах реализации изобретения можно проводить конъюгацию с компонентом, который повышает стабильность или эффективность связывающей молекулы, на-

пример связывающего полипептида, например антитела или его иммуноспецифического фрагмента. Например, в одном варианте реализации изобретения связывающие молекулы согласно изобретению можно конъюгировать с ПЭГ, чтобы увеличить их время полужизни *in vivo*. Leong et al., *Cytokine* 16 (2001), 106; *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54 (2002), 531 или Weir et al., *Biochem. Soc. Transactions* 30 (2002), 512.

VI. Композиции и способы применения.

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим вышеуказанную тау-связывающую молекулу, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, или его производное или вариант, или полинуклеотид, вектор или клетку согласно изобретению. Композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные агенты, такие как интерлейкины или интерфероны, в зависимости от предназначения фармацевтической композиции. В случае применения для лечения таупатического заболевания, например болезни Альцгеймера, дополнительный агент можно выбрать из группы, состоящей из небольших органических молекул, анти-тау антител и их комбинаций. Следовательно, в конкретном варианте реализации настоящее изобретение относится к применению тау-связывающей молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, или связывающей молекулы, обладающей практически такой же специфичностью связывания, как и любой из вышеперечисленных компонентов, полинуклеотида, вектора или клетки согласно настоящему изобретению для изготовления фармацевтической или диагностической композиции для профилактического и терапевтического лечения таупатического заболевания, отслеживания прогрессирования таупатического заболевания или ответа на лечение таупатического заболевания у субъекта, или для определения риска развития у субъекта таупатического заболевания.

Следовательно, в одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу лечения неврологического нарушения, характеризуемого аномальным накоплением и/или отложением тау соответственно в головном мозге и центральной нервной системе, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества любых из вышеописанных тау-связывающих молекул, антител, полинуклеотидов, векторов или клеток согласно настоящему изобретению. Термин "неврологическое нарушение" включает, но не ограничивается этим, таупатическое заболевание, такое как болезнь Альцгеймера, комплекс амиотрофический боковой склероз/паркинсонизм-деменция, аргирофильная гранулярная деменция, амилоидная ангиопатия британского типа, церебральная амилоидная ангиопатия, кортикобазальная дегенерация, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменция боксеров, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, синдром Дауна, лобно-височная деменция, лобно-височная деменция с паркинсонизмом, сцепленная с хромосомой 17, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца, миозит с включенными тельцами, множественная системная атрофия, миотоническая дистрофия, болезнь Ниманна-Пика типа С, негуамская болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, болезнь Пика, постэнцефалитический паркинсонизм, связанная с прионными белками церебральная амилоидная ангиопатия, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменция с клубками, мультиинфарктная деменция и ишемический инсульт. Если не указано иное, термины нейродегенеративный, неврологический или нейропсихиатрический взаимозаменяемо используются в данном документе.

Конкретным преимуществом терапевтического подхода согласно настоящему изобретению является факт, что антитела согласно настоящему изобретению получены из В-клеток или В-клеток памяти от здоровых человеческих субъектов без признаков таупатического заболевания и, следовательно, с определенной вероятностью способны предотвращать клиническое проявление таупатического заболевания или снижать риск возникновения клинического проявления заболевания, или откладывать начало или прогрессирование клинического проявления заболевания. Как правило, антитела согласно настоящему изобретению уже успешно прошли стадию соматического созревания, т.е. оптимизацию в отношении избирательности и эффективности высокоаффинного связывания с целевой молекулой тау, посредством соматической вариации переменных областей антитела.

То, что такие клетки *in vivo*, например, в организме человека не активировались посредством родственных или других физиологических белков или клеточных структур в смысле аутоиммунологической или аллергической реакции, также очень важно в медицинском смысле, так как это свидетельствует о существенно повышенном шансе успешного прохождения фаз клинического исследования. Если можно так сказать, эффективность, приемлемость и переносимость были продемонстрированы по меньшей мере для одного человеческого субъекта еще до предклинической и клинической разработки профилактического или терапевтического антитела. Таким образом, можно ожидать, что в случае человеческих анти-тау антител согласно настоящему изобретению их целевая структурно-специфическая эффективность в качестве терапевтического агента и сниженная вероятность возникновения побочных эффектов существенно повысят клиническую вероятность успеха.

Также в настоящем изобретении предложен фармацевтический или диагностический, соответственно, пакет или набор, содержащий одну или более емкостей, наполненных одним или более из выше-

описанных ингредиентов, например анти-тау антителом, его связывающим фрагментом, производным или вариантом, полинуклеотидом, вектором или клеткой согласно настоящему изобретению. К этой(им) емкости(ям) может прилагаться приписка в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, в которой отражено разрешение на использование для применения на людях от агентства по производству, применению или продаже. В дополнительном или альтернативном варианте набор содержит реагенты и/или инструкции для применения в соответствующих диагностических методах. Композиция, например набор согласно настоящему изобретению, конечно, подходит для оценки риска, диагностирования, предотвращения и лечения нарушения, которое сопровождается наличием тау и, в частности, может применяться для лечения болезни Альцгеймера (БА), комплекса амиотрофический боковой склероз/паркинсонизм-деменция (АБС-ПД), аргирофильной гранулярной деменции (АГД), амилоидной ангиопатии британского типа, церебральной амилоидной ангиопатии, кортикобазальной дегенерации (КБД), болезни Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), деменции боксеров, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, синдрома Дауна, лобно-височной деменции, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, сцепленной с хромосомой 17 (ЛВДП-17), лобно-височной лобарной дегенерации, болезни Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезни Галлервордена-Шпатца, миозита с включенными тельцами, множественной системной атрофии, миотонической дистрофии, болезни Ниманна-Пика типа С (НП-С), негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, болезни Пика (БП), постэнцефалитического паркинсонизма, связанной с прионными белками церебральной амилоидной ангиопатии, прогрессирующего субкортикального глиоза, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), подострого склерозирующего панэнцефалита, деменции с клубками, мультиинфарктной деменции и ишемического инсульта.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению можно изготавливать в соответствии с хорошо известными в данной области техники способами; см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие такие растворы, можно изготавливать хорошо известными традиционными методами. Эти фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозировке. Введение подходящих композиций можно осуществлять разными путями, например путем внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, интраназального, местного или интрадермального введения или доставки в спинной или головной мозг. Аэрозольные лекарственные формы, такие как назальный спрей, содержат очищенные водные или другие растворы активного агента с консервирующими агентами и изотоническими агентами. Такие лекарственные формы доводят до определенного уровня pH и изотонического состояния, совместимого со слизистой оболочкой носа. Лекарственные формы для ректального или вагинального введения могут быть представлены в виде суппозитория с подходящим носителем.

Кроме того, поскольку настоящее изобретение включает стандартную (хотя, к счастью, несчастую) на сегодняшний день процедуру просверливания в черепе небольшого отверстия для введения лекарственного препарата согласно настоящему изобретению, в одном аспекте связывающая молекула, в частности антитело или лекарственный препарат на основе антитела согласно настоящему изобретению, может проникать через гематоэнцефалический барьер, что делает возможным внутривенное или пероральное введение.

Режим дозирования определяется лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в области техники медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая массу пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие параллельно вводимые лекарственные препараты. Типичная доза может соответствовать, например, диапазону от 0,001 до 1000 мкг (или нуклеиновой кислоты для экспрессии или для подавления экспрессии в этом диапазоне); при этом предусматриваются дозы, находящиеся ниже или выше этого типового диапазона, в частности, с учетом вышеуказанных факторов. В целом дозировка может соответствовать диапазону, например, от около 0,0001 до 100 мг/кг, обычно от 0,01 до 5 мг/кг (например, 0,02, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 мг/кг и т.д.) массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела, или в диапазоне 1-10 мг/кг, или по меньшей мере 1 мг/кг. Промежуточные дозировки из вышеприведенного диапазона также входят в объем изобретения. Субъектам можно вводить такие дозы ежедневно, через день, еженедельно или в соответствии с любой другой схемой, определенной эмпирическим анализом. Типовое лечение включает введение множественных доз в течение длительного времени, например, на протяжении по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные типовые режимы лечения включают введение раз каждые две недели или раз в месяц, или раз в каждые 3 или 6 месяцев. Типовые схемы дозирования включают 1-10 или 15 мг/кг в последовательные дни, 30 мг/кг через день или 60 мг/кг еженедельно. В некоторых способах два или более моноклональных антител с разной специфичностью связывания вводят одновременно, при этом дозировка каждого вводимого антитела попадает в указанные диапазоны. Прогресс можно отслеживать, проводя

периодическую оценку. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртоводные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые и забуференные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу с хлоридом натрия, лактат Рингера или жирные масла. Внутривенные носители включают жидкие и питательные наполнители, электролитические наполнители (такие как наполнители на основе декстрозы Рингера) и тому подобное. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные препараты, антиоксиданты, хелатирующие агенты, а также инертные газы и тому подобное. Кроме того, фармацевтическая композиция согласно изобретению может содержать дополнительные агенты, такие как допамин или психофармакологические лекарственные препараты, в зависимости от предназначения фармацевтической композиции.

Кроме того, в конкретном варианте реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция может быть изготовлена в виде вакцины, например, если фармацевтическая композиция согласно изобретению содержит анти-тау антитело или его связывающий фрагмент, производное или вариант для пассивной иммунизации. Как указано в разделе, описывающем уровень техники, сообщалось о внеклеточном присутствии разновидности фосфор-тау в плазме крови и ЦСЖ (Aluise et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1782 (2008), 549-558), а исследования на трансгенных мышинных линиях с применением активной вакцинации фосфорилированными пептидами тау выявили снижение уровней агрегатов тау в головном мозге и замедление прогрессирования поведенческих нарушений (Sigurdsson, J. *Alzheimers. Dis.* 15 (2008), 157-168; Voimel et al., *Exp. Neurol.* 224 (2010), 472-485). Соответственно, можно ожидать, что пассивная иммунизация человеческими анти-тау антителами и эквивалентными им тау-связывающими молекулами согласно настоящему изобретению поможет устранить некоторые побочные эффекты концепции терапии с применением активной иммунизации, что уже обсуждалось в разделе, описывающем уровень техники. Следовательно, настоящие анти-тау антитела и их эквиваленты согласно настоящему изобретению могли бы быть полезны в качестве вакцины для предотвращения или облегчения таупатических заболеваний, таких как БА, АБС-ПД, АГД, КБД, БКЯ, ЛВД, ЛВДП-17, НР-С, БП, 11Н11, или других таупатий, указанных выше.

В одном варианте реализации изобретения целесообразно применять рекомбинантные биспецифические или мультиспецифические конструкции антитела согласно настоящему изобретению. См. ссылку Fischer and Léger, *Pathobiology* 74 (2007), 3-14. Такую биспецифическую молекулу можно сконструировать для нацеливания на тау одним связывающим плечом и на другое патологическое вещество, такое как Аβ или альфа-синуклеин или отличная патологическая конформация тау, вторым связывающим плечом. В альтернативном варианте второе связывающее плечо можно сконструировать для нацеливания на белок, присутствующий в гематоэнцефалическом барьере, для облегчения проникновения антитела в мозг.

В одном варианте реализации изобретения целесообразно применять рекомбинантные Fab (rFab) и одноцепочечные фрагменты (scFvs) антитела согласно настоящему изобретению, которые могут с большей вероятностью проникать через клеточную мембрану. Например, в Robert et al., *Protein Eng. Des. Sel.* (2008) Oct 16; S1741-0134, опубликованной онлайн, описано применение химерных рекомбинантных Fab (rFab) и одноцепочечных фрагментов (scFvs) моноклонального антитела WO-2, которое распознает эпитоп в N-терминальной области Аβ. Сконструированные фрагменты были способны (i) предотвращать фибриллизацию амилоида, (ii) дезагрегировать предварительно сформированные фибриллы Аβ1-42 и (iii) ингибировать олигомер-опосредованную нейротоксичность Аβ1-42 *in vitro* так же эффективно, как и полная молекула IgG. Очевидные преимущества применения антител небольшого формата в виде сконструированных Fab и scFv с отсутствием эффекторной функции включают более эффективное прохождение через гематоэнцефалический барьер и минимизацию риска вызвать побочные воспалительные реакции. Кроме того, что scFv и однодоменные антитела сохраняют специфичность связывания полноразмерных антител, они могут экспрессироваться как одиночные гены и внутриклеточно в клетках млекопитающих как интраантитела с потенциалом в отношении изменения сворачивания, взаимодействий, модификаций или субклеточной локализации их мишеней; см. обзор, например, Miller and Messer, *Molecular Therapy* 12 (2005), 394-401.

В другом подходе в Muller et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2005), 237-241 описана технологическая платформа, так называемая "технология супер-антитела", которая, как считается, обеспечивает возможность переноса антител в живые клетки, не повреждая их. Такие проникающие в клетки антитела открывают новые диагностические и терапевтические горизонты. Для этих антител был придуман термин "TransMabs".

В дополнительном варианте реализации изобретения необходимо совместное введение или последовательное введение других антител, применимых для лечения таупатического заболевания. В одном варианте реализации изобретения дополнительное антитело содержится в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры антител, которые можно применять для лечения субъ-

екта, включают, но не ограничиваются этим, антитела, нацеленные на бета-амилоид, альфа-синуклеин, TDP-43 и SOD-1.

В дополнительном варианте реализации изобретения необходимо совместное введение или последовательное введение других нейропротекторных агентов, применимых для лечения таупатического заболевания. В одном варианте реализации изобретения дополнительный агент содержится в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры нейропротекторных агентов, которые можно применять для лечения субъекта, включают, но не ограничиваются этим, ингибитор ацетилхолинэстеразы, антагонист глутаматергического рецептора, ингибиторы киназы, ингибиторы гистондеацетилазы, противовоспалительные агенты, дивалпрокс натрия или любые их комбинации. Примеры других нейропротекторных агентов, которые можно применять параллельно с фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению, описаны в данной области техники; см., например, международную заявку WO2007/011907. В одном варианте реализации изобретения дополнительный агент представляет собой допамин или антагонист рецептора допамина.

Терапевтически эффективная доза или количество означает количество активного ингредиента, достаточное для облегчения симптомов или патологического состояния. Терапевтическую эффективность и токсичность таких соединений можно определить при помощи стандартных фармацевтических процедур в клеточных культурах или экспериментальных животных, например ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции) и LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение терапевтического и токсического эффектов дозы называется терапевтическим индексом и может быть выражено в виде соотношения LD₅₀/ED₅₀. В одном варианте реализации изобретения терапевтический агент присутствует в композиции в количестве, достаточном для восстановления или сохранения нормального поведения и/или когнитивных свойств в случае БА, АБС-ПД, АГД, КБД, БКЯ, ЛВД, ЛВДП-17, НР-С, БП, ПНП или других таупатий, указанных выше.

Из вышеописанного очевидно, что настоящее изобретение включает в себя любое применение тау-связывающей молекулы, содержащей по меньшей мере одну CDR вышеописанного антитела, в частности, для диагностирования и/или лечения вышеуказанного таупатического заболевания, в частности болезни Альцгеймера. В одном варианте реализации изобретения указанная связывающая молекула представляет собой антитело согласно настоящему изобретению или его иммуноглобулиновую цепь. Кроме того, настоящее изобретение относится к антиидиотипическим антителам любого из указанных антител, ранее описанных в данном документе. Это такие антитела или другие связывающие молекулы, которые связываются с уникальной антигенной пептидной последовательностью, расположенной в вариабельной области антитела вблизи антигенсвязывающего сайта и применимы, например, для выявления анти-тау антител в полученном от субъекта образце.

В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к диагностической композиции, содержащей любую из вышеописанных тау-связывающих молекул, антител, антигенсвязывающих фрагментов, полинуклеотидов, векторов или клеток согласно изобретению и необязательно подходящие средства для выявления, такие как реагенты, традиционно применяемые в иммунных или основанных на применении нуклеиновых кислот диагностических способах. Например, антитела согласно изобретению подходят для применения в методах иммуноанализа, в которых их можно использовать в жидкой фазе или связанными с твердофазным носителем. Примеры методов иммуноанализа, в которых можно применять антитело согласно изобретению, представляют собой конкурентные и неконкурентные методы иммуноанализа в прямом или непрямом формате. Примерами таких методов иммуноанализа являются радиоиммуноанализ (RIA), (иммунометрический) сэндвич-анализ, проточная цитометрия и вестерн-блоттинг. Антигены и антитела согласно изобретению можно связывать со многими различными носителями и применять для выделения клеток, которые с ними специфически связываются. Примеры хорошо известных носителей включают стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозу, природную и модифицированную целлюлозу, полиакриламиды, арагозы и магнетит. По природе носитель может быть как растворимым, так и нерастворимым, в зависимости от целей изобретения. Существует большое количество разных меток и способов мечения, известных специалистам в данной области техники. Примеры типов меток, которые можно применять в настоящем изобретении, включают ферменты, радиоизотопы, коллоидные металлы, флуоресцентные соединения, хемилюминесцентные соединения и биолуминесцентные соединения; см. также варианты реализации, которые обсуждались выше.

В дополнительном варианте реализации изобретения связывающие тау молекулы, в частности антитела согласно настоящему изобретению, также можно применять в способе диагностирования нарушения у индивида путем получения образца жидкости организма исследуемого индивида, который может представлять собой образец крови, образец лимфы или любой другой образец жидкости организма, и приведения в контакт образца жидкости организма с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, в которых возможно образование комплексов антитело-антиген. Затем уровень таких комплексов определяют при помощи способов, известных в данной области техники, при этом уровень, существенно превышающий уровень в контрольном образце, свидетельствует о наличии заболевания у исследуемого индивида. Аналогичным образом можно применять специфическое связывание антигенов антителами

согласно изобретению. Таким образом, настоящее изобретение относится к методу *in vitro* иммуноанализа, включающему применение связывающей молекулы, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению.

В этом контексте настоящее изобретение также относится к средствам, специально разработанным в этих целях. Например, можно применять чип на основе антител, который, например, загружают антителами или эквивалентными антигенсвязывающими молекулами согласно настоящему изобретению, которые специфически распознают тау. Дизайн методов иммуноанализа с использованием микрочипов приведен в Kusnezow et al., *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Соответственно, настоящее изобретение также относится к микрочипам, загруженным связывающими тау молекулами, определяемыми в соответствии с настоящим изобретением.

В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу диагностирования таупатического заболевания у субъекта, включающему определение наличия тау и/или патологически модифицированного и/или агрегированного тау в образце, полученном от диагностируемого субъекта, при помощи по меньшей мере одного антитела согласно настоящему изобретению, его тау-связывающего фрагмента или тау-связывающей молекулы, обладающей практически такой же специфичностью связывания, как и любой из вышеперечисленных компонентов, при этом наличие патологически модифицированного и/или агрегированного тау свидетельствует о наличии нейродегенеративной таупатии, а повышение уровня патологически модифицированного и/или агрегированного тау по сравнению с уровнем физиологических форм тау свидетельствует о прогрессировании нейродегенеративной таупатии у указанного субъекта.

Диагностируемый субъект может быть бессимптомным или предклиническим в отношении заболевания. В одном варианте реализации изобретения контрольный субъект имеет таупатическое заболевание, например БА, АБС-ПД, АГД, КБД, БКЯ, ЛВД, ЛВДП-17, НР-С, БП, ПНП или другие таупатии, указанные выше, при этом сходство между уровнем патологически модифицированного и/или агрегированного тау и стандартной величиной свидетельствует о том, что диагностируемый субъект имеет таупатическое заболевание. В альтернативном или дополнительном варианте второй контрольный субъект не имеет таупатического заболевания, при этом разница между уровнем тау и/или патологически модифицированного и/или агрегированного тау и стандартной величиной свидетельствует о том, что диагностируемый субъект имеет таупатическое заболевание. В одном варианте реализации изобретения диагностируемый субъект и контрольный(ые) субъект(ы) находятся в одной возрастной группе. Образцом для анализа может быть любая жидкость организма, в которой предполагается содержание патологически модифицированного и/или агрегированного тау, например образец крови, ЦСЖ или мочи.

Уровень тау и/или патологически модифицированного и/или агрегированного тау можно оценить любым подходящим способом, известным в данной области техники, включая, например, проведение анализа тау одним или более методами, выбранными из вестерн-блоттинга, иммунопреципитации, ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (RIA), флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS), двумерного гель-электрофореза, масс-спектропии (MS), матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации - времяпролетной масс-спектропии (MALDI-TOF), усиленной поверхностью лазерной десорбции/ионизации - времяпролетной масс-спектропии (SELDI-TOF), высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC), многомерной жидкостной хроматографии (LC) с последующей тандемной масс-спектрометрией (MS/MS) и лазерной денситометрии. В одном варианте реализации изобретения *in vivo* визуализация тау включает позитронно-эмиссионную томографию (PET), однофотонную эмиссионную томографию (SPECT), оптическую визуализацию в ближней инфракрасной области (NIR) или магнитно-резонансную визуализацию (MRI).

Способы диагностирования таупатического заболевания, такого как болезнь Альцгеймера, отслеживания прогрессирования таупатического заболевания и отслеживания лечения таупатического заболевания при помощи антител и связанных с ними средств, которые можно адаптировать в соответствии с настоящим изобретением, также описаны в международных заявках WO93/08302, WO94/13795, WO95/17429, WO96/04309, WO2002/062851 и WO2004/016655. Аналогично, методы выявления тау на основе антител описаны в международной заявке WO2005/080986, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Эти способы можно применять согласно описанию, но используя при этом тау-специфическое антитело, связывающий фрагмент, производное или вариант согласно настоящему изобретению.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение также относится к пептидам, содержащим эпитоп тау, специфически распознаваемый антителом согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации изобретения такой пептид содержит, состоит или преимущественно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: остатков 125-131, 397-441, 226-244, 217-227, 37-55, 387-406, 421-427, 427-439, 1-158, 197-207, 57-67, 355-441, 313-319, 309-319, 221-231 из SEQ ID NO: 6 и любых их комбинаций, и их модифицированной последовательности, в которой одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь или более аминокислот были замещены, удалены и/или добавлены, при этом пептид распознается антителом согласно настоящему изобретению.

В одном варианте реализации изобретения такой пептид можно применять для диагностирования нейродегенеративной таупатии у субъекта, включая этап определения наличия антитела, которое связывается с пептидом в биологическом образце, полученном от указанного субъекта, и применения для диагностирования таупатии у указанного субъекта путем измерения уровней антител, которые распознают вышеописанный пептид согласно настоящему изобретению, и сравнения измерений с уровнями, характерными для здоровых субъектов сопоставимого возраста и пола. Повышенный измеренный уровень антител, специфических в отношении указанного пептида согласно настоящему изобретению, будет свидетельствовать о диагностировании таупатии у указанного субъекта. Пептид согласно настоящему изобретению можно изготовить в матрице, наборе и композиции, соответственно, как описано выше.

Эти и другие варианты реализации изобретения раскрыты и включены в описание и примеры настоящего изобретения. Дополнительную литературу, касающуюся любого из этих материалов, способов, использования и соединений для применения в соответствии с настоящим изобретением, можно посмотреть в общедоступных библиотеках и базах данных, используя, например, электронные устройства. Например, можно использовать общедоступную базу данных "Medline", поддерживаемую Национальным центром биотехнологической информации и/или Национальной библиотекой медицины при национальном институте здоровья. Дополнительные базы данных и веб-адреса, например, Европейского института биоинформатики (EBI), который является частью Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL), известны специалисту в данной области техники, а также их можно найти, используя поисковые системы интернета. Обзор патентной информации по биотехнологии и обзор соответствующих источников патентной информации, удобный для ретроспективного поиска и сигнальной информации, приведен в Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

Приведенное выше описание в общих чертах описывает настоящее изобретение. Если не указано иное, употребляемые в данном документе термины соответствуют определениям, приведенным в Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, пересмотренном в 2000 г. и повторно напечатанном в 2003 г., ISBN 0198506732. В тексте данного изобретения приведены ссылки на некоторые документы. Полные библиографические ссылки можно найти в конце описания непосредственно перед формулой изобретения. Содержание всех перечисленных ссылок (включая ссылки на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки, перечисленные в данной заявке, а также спецификации и инструкции производителя и т.д.) включено в данный документ посредством ссылки; при этом ни один из перечисленных документов не признается как уровень техники, известный до даты приоритета настоящего изобретения.

Более полное понимание может обеспечить ссылка на нижеприведенные примеры, которые включены в данный документ исключительно в иллюстративных целях и не ограничивают объем изобретения.

Примеры

Нижеприведенные примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но их не следует воспринимать как ограничивающие объем изобретения. Эксперименты в нижеприведенных примерах проиллюстрированы и описаны в отношении антител NI-105.4E4, NI-105.24B2 и NI-105.4A3 в том виде, в котором они были клонированы, т.е. Ig-вариабельных областей каркасной области 1 (FR1) без приведения в соответствие с последовательностями зародышевой линии (GL) человеческих вариабельных тяжелой и легкой цепей; см. фиг. 1.

Материалы и методы.

Подробные описания традиционных методов, таких как применяемые в данном документе, можно найти в перечисленной литературе; см. также "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" Seventeenth Ed. edited by Beers and Berkow (Merck & Co., Inc. 2003) и заявку на патент США № 2012/0087861, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Для практической реализации настоящего изобретения применяют, если не указано иное, традиционные методы клеточной биологии, клеточного культивирования, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантных ДНК и иммунологии, которые относятся к данной области техники. Для дополнительной разработки общих методов, применяемых для практической реализации данного изобретения, экспериментатор может обратиться к стандартным руководствам и обзорам по клеточной биологии и тканевому культивированию; см. также ссылки, перечисленные в примерах. Описание общих способов молекулярной и клеточной биохимии можно найти в таких стандартных руководствах, как Molecular Cloning:

A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook *et al.*, Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames and Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (Ausubel *et al.*, eds.); и Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu *et al.*, eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986). Protein Methods (Bollag *et al.*, John Wiley & Sons 1996); Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner *et al.* eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplitt & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997); и Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998).

Реагенты, клонирующие векторы и наборы для генетических манипуляций, соответствующие данному изобретению, доступны от коммерческих производителей, таких как BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich и ClonTech. Общие методы клеточного культивирования и сбора сред описаны в Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375) и Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch *et al.*, Bioprocess Technol. 19 (1990), 251); Extracting information from cDNA arrays, Herzel *et al.*, CHAOS 11 (2001), 98-107.

Способы определения тау-специфических В-клеток и клонирование соответствующих антител.

Если ниже не указано иное, определение тау-специфических В-клеток и молекулярное клонирование анти-тау антител, демонстрирующих представляющую интерес специфичность, а также их рекомбинантная экспрессия и определение функциональных характеристик были или могут быть в целом проведены так, как описано в разделе Примеров и Вспомогательных методов международной заявки РСТ/ЕР2008/000053, опубликованной как WO2008/081008, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки; см. также заявку на патент США № 2012/0087861, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. В рамках данной заявки предложен новый способ определения тау-специфических В-клеток и молекулярного клонирования антител к тау, демонстрирующих представляющую интерес специфичность, а также их рекомбинантной экспрессии и определения функциональных характеристик. Как описано выше, в одном варианте реализации настоящего изобретения культивируют культуры одиночных или олигоклональных В-клеток, а супернатант культуры, который содержит антитела, вырабатываемые указанными В-клетками, исследуют в отношении наличия в нем анти-тау антител и их аффинности. Процесс исследования включает этапы чувствительного анализа иммунореактивности тканевых бляшек (ТАPIR), описанного в международной заявке WO2004/095031, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки, и проиллюстрированного на фиг. 3; исследования срезов мозга в отношении связывания с PHFТау, как описано в примере 2; исследования в отношении связывания пептида, полученного из тау с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, с фосфатными группами на аминокислотах Ser-202 и Thr-205; на аминокислоте Thr-231; и/или на аминокислотах Ser-396 и Ser-404 указанной последовательности, аналогично описанию примера 3 с нефосфорилированными пептидами вследствие экспериментов с конформацией эпитопов для антитела NI-105.4E4; исследования в отношении связывания рекомбинантного человеческого тау с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, и выделения антитела, для которого выявлено связывание, или клетки, вырабатывающей указанное антитело, как описано в международном патенте WO2008/081008 и как описано в примере 1. Очистка антигена Рекомбинантный человеческий Тау40 был приобретен у rPeptide (Bogart, GA, USA). PHFТау был выделен из пораженного БА мозга.

Выделение спаренных спиральных филаментов, содержащих патологически фосфорилированные

филаменты тау (PHFTau), проводили, следуя методу Goedert et al. (Goedert et al., Neuron 8 (1992), 159-168) с модификациями. 1 г пораженной БА ткани головного мозга разрезали на 5-мм кусочки и удаляли все видимые кровеносные сосуды. Ткань трижды промывали 40 мл охлажденного до температуры заморозки промывочного раствора (100 мМ Трис, pH 7,4, 6 мМ ЭГТУ, 1 мМ Na₃VO₄ и 1 мМ NaF) с последующей гомогенизацией с 20 мл лизисного буфера (10 мМ Трис, pH 7,4, 0,8 М NaCl, 1 мМ ЭГТУ, 1× коктейля из ингибиторов протеаз, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF, 1 мМ АЭБСФ, 10% цукрозы). Гомогенат центрифугировали при 4°C при 20000×g на протяжении 20 мин. Собирали супернатант с добавлением N-лауроилсаркозината (Sigma, Switzerland) до 1% (м/об.). После 2-часовой инкубации при 37°C со встряхиванием супернатант центрифугировали при 4°C при 100000×g на протяжении 1 ч. Осадок собирали и перерастворили в ФСБ. После удаления возможных загрязняющих иммуноглобулинов при помощи магнитных гранул с протеином А суспензию PHFTau хранили при -80°C до применения. Контрольный экстракт, полученный из здоровой контрольной ткани головного мозга человека, готовили соответствующим способом.

Исследование человеческого антитела к тау ELISA.

96-луночные микропланшеты с половинным объемом лунок (Corning) покрывали рекомбинантным белком тау (rPeptide, Bogart, USA) в стандартной концентрации 1 мкг/мл в карбонатном покрывающем буфере ELISA (pH 9,6) на протяжении ночи при 4°C. Для исследования PHFTau 96-луночные микропланшеты для иммобилизации (Nunc, Denmark) покрывали PHFTau, экстрагированным из пораженного БА человеческого мозга, при разведении 1:100 в карбонатном покрывающем буфере ELISA (pH 9,6) на протяжении ночи при 4°C. Планшеты промывали в ФСБ-Т, pH 7,6, а неспецифические связывающие сайты блокировали на 2 ч при КТ при помощи ФСБ-Т, содержащего 2% БСА (Sigma, Buchs, Switzerland). Кондиционированную содержащую В-клетки среду переносили из культуральных планшетов для В-клеток памяти в планшеты ELISA и инкубировали на протяжении 1 ч при КТ. Планшеты ELISA промывали в ФСБ-Т, а затем инкубировали с конъюгированными с пероксидазой хрена (ПХ) ослиными поликлональными антителами к человеческому IgG (специфическими к Fcγ-фрагменту) (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK). После промывания ФСБ-Т определяли связывание человеческих антител путем измерения активности ПХ стандартным колориметрическим методом.

Исследование в микропланшетах MULTI-ARRAY®.

Стандартные 96-луночные 10-электродные планшеты MULTI-SPOT (Meso Scale Discovery, USA) покрывали 30 мкг/мл rTau (rPeptide), PHFTau, экстрагированного из мозга, и экстракта из здорового контрольного мозга в ФСБ. Неспецифические связывающие сайты блокировали на 1 ч при КТ при помощи ФСБ-Т, содержащего 3% БСА, с последующей инкубацией с содержащей В-клетки кондиционированной средой на протяжении 1 ч при КТ. Планшеты промывали в ФСБ-Т, а затем инкубировали с конъюгированным с SULFO-Tag античеловеческим поликлональным антителом (Meso Scale Discovery, USA). После промывания ФСБ-Т выявляли связывание антитела при помощи электрохемилюминесцентных измерений, проводимых при помощи SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery, USA).

Молекулярное клонирование антител к тау.

Образцы, содержащие В-клетки памяти, получали от здоровых человеческих субъектов. Собирали живые В-клетки из селектированных культур В-клеток памяти и получали мРНК. Затем, используя метод гнездовой ПЦР, получали последовательности тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина.

Комбинацию праймеров, представляющую весь набор семейств последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии, применяли для амплификации лидерных пептидов, V-сегментов и J-сегментов. Первый этап амплификации проводили, используя праймеры, специфические к лидерному пептиду, в 5'-конце и праймеры, специфические к константной области, в 3'-конце (Smith et al., Nat Protoc. 4 (2009), 372-384). Для тяжелых цепей и каппа легких цепей проводили второй этап амплификации, используя праймеры, специфические к V-сегменту, в 5'-конце и праймеры, специфические к J-сегменту, в 3'-конце. Для лямбда легких цепей проводили второй этап амплификации, используя праймеры, специфические к V-сегменту, в 5'-конце и праймеры, специфические к C-области, в 3'-конце (Marks et al., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard et al., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).

Определение клона антитела, обладающего желаемой специфичностью, проводили при помощи повторного исследования методом ELISA после рекомбинантной экспрессии полных антител. Рекомбинантную экспрессию полных человеческих IgG1 антител или химерных IgG2a антител получали после вставки последовательностей вариабельной тяжелой и легкой цепи "в правильной рамке считывания" в экспрессионные векторы, дополняя последовательность вариабельной области последовательностью, кодирующей лидерный пептид в 3'-конце, и последовательностью, кодирующей соответствующий константный(ые) домен(ы) в 5'-конце. Для этого праймеры содержали рестрикционные сайты, сконструированные для облегчения клонирования последовательностей вариабельной тяжелой и легкой цепей в экспрессионные векторы для антитела. Иммуноглобулины, содержащие тяжелую цепь, экспрессируют посредством вставки ОФ-ПЦР-продукта тяжелой цепи иммуноглобулина в рамку с экспрессионным вектором тяжелой цепи, несущим сигнальный пептид и константные домены человеческого иммуноглобулина гамма 1 или мышиного иммуноглобулина гамма 2a. Иммуноглобулины, содержащие каппа легкую цепь,

экспрессируют посредством вставки ОФ-ПЦР-продукта каппа легкой цепи в рамку с экспрессионным вектором легкой цепи, обеспечивающим сигнальный пептид и константный домен человеческого иммуноглобулина, содержащего каппа легкую цепь. Иммуноглобулины, содержащие лямбда легкую цепь, экспрессируют посредством вставки ОФ-ПЦР-продукта лямбда легкой цепи в рамку с экспрессионным вектором лямбда легкой цепи, обеспечивающим сигнальный пептид и константный домен человеческого или мышиного иммуноглобулина, содержащего лямбда легкую цепь.

Функциональные рекомбинантные моноклональные антитела получают после котрансфекции в клетки НЕК293 или клетки CHO (или любую другую реципиентную клеточную линию человеческого или мышиного происхождения) экспрессионного вектора, содержащего тяжелую цепь Ig, и экспрессионного вектора, содержащего каппа или лямбда легкую цепь Ig. После этого рекомбинантное человеческое моноклональное антитело очищают от кондиционированной среды при помощи стандартного способа очистки на колонке с протеином А. Рекомбинантное человеческое моноклональное антитело можно получать в неограниченных количествах, применяя как временно, так и стабильно трансфицированные клетки. Стабильные клеточные линии, вырабатывающие рекомбинантное человеческое моноклональное антитело, можно получить, применяя непосредственно Ig-экспрессионные векторы, или путем повторного клонирования Ig-вариабельных областей в разные экспрессионные векторы. Также из этих Ig-вариабельных областей можно получить производные, такие как F(ab), F(ab)₂ и scFv.

Антитела.

Мышиное моноклональное античеловеческое антитело к тау Tau12 (Covance, California, U.S.A.) и мышиное моноклональное антитело к тау AT80 (Thermo Scientific, U.S.A.) применяли, следуя инструкциям производителя. Рекомбинантные человеческие антитела к тау NI-105.4E4, NI-105.24B2 и NI-105.4A3 описаны в заявке на патент США № 2012/0087861, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Рекомбинантные человеческие антитела к тау NI-105.17C1, NI-105.17C1(N31Q), NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6 и NI-105.9C4 представляют собой антитела, являющиеся объектами данного изобретения. Их экспрессировали в клетках FIEK293 или CHO, очищали от кондиционированной среды и использовали непосредственно для последующих применений, если не указано иное.

Direct ELISA.

96-луночные микропланшеты (Costar, Corning, USA) покрывали рекомбинантным белком тау (hTau40, rPeptide, Bogart, USA), разведенным до концентрации 1 мкг/мл в карбонатном покрывающем буфере ELISA (50 мМ, pH 9,6), при 4°C на протяжении ночи. Неспецифические связывающие сайты блокировали на 2 ч при КТ при помощи ФСБ, содержащего 2% БСА (Sigma, Buchs, Switzerland) и 0,5% Твин20. Связывание человеческих антител согласно настоящему изобретению определяли, используя ПХ-конъюгированный козий античеловеческий IgG Fcγ (Jackson immunoResearch, Newmarket, UK), с последующим измерением активности ПХ стандартным колориметрическим методом. Величины EC₅₀ оценивали методом нелинейного регрессионного анализа при помощи программного обеспечения GraphPad Prism (San Diego, USA).

Окрашивание белков методом вестерн-блоттинга.

PHFTau и рекомбинантный hTau40 разделяли в градиентном ДСН-ПААГ (NuPAGE 4-12%; Invitrogen, Basel, Switzerland) с последующим электроблоттингом на нитроцеллюлозных мембранах. После блокирования неспецифического связывания 2% БСА при комнатной температуре на протяжении 1 ч блоты инкубировали на протяжении ночи с первичными человеческими анти-тау антителами или Tau12 (мышиное моноклональное антитело, Covance, California, U.S.A.), а потом - с ПХ-конъюгированным козьим анти-человеческим IgGFcγ (в случае первичных человеческих антител) или ПХ-конъюгированным козьим анти-мышинным IgG вторичным антителом.

Блоты выявляли методом ЭХЛ и ImageQuant 350 (GE Healthcare, Otelfingen, Switzerland).

Экстракция PHFTau из пораженного БА мозга.

Выделение спаренных спиральных филаментов, содержащих патологически фосфорилированные филаменты тау (PHFTau), проводили, следуя методу Goedert et al. (Goedert et al., Neuron 8 (1992), 159-168) с модификациями. 1 г пораженной БА ткани головного мозга разрезали на 5-мм кусочки и удаляли все видимые кровеносные сосуды. Ткань трижды промывали 40 мл охлажденного до температуры замораживания промывочного раствора (100 мМ Трис, pH 7,4, 6 мМ ЭГТУ, 1 мМ Na₃VO₄ и 1 мМ NaF) с последующей гомогенизацией с 20 мл лизисного буфера (10 мМ Трис, pH 7,4, 0,8 М NaCl, 1 мМ ЭГТУ, 1× коктейля из ингибиторов протеаз, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF, 1 мМ АЭБСФ, 10% цукрозы). Гомогенат центрифугировали при 4°C при 20000×g на протяжении 20 мин. Собирали супернатант с добавлением N-лауроилсаркозината (Sigma, Switzerland) до 1% (м/об.). После 2-часовой инкубации при 37°C со встряхиванием супернатант центрифугировали при 4°C при 100000×g на протяжении 1 ч. Осадок собирали и перерастворили в ФСБ. После удаления возможных загрязняющих иммуноглобулинов при помощи магнитных гранул с протеином А, суспензию PHFTau хранили при -80°C до применения. Контрольный экстракт, полученный из здоровой контрольной ткани головного мозга человека, готовили соответствующим

щим способом.

Синтез пептидов тау.

Пептид, соответствующий аминокислотам 333-346 hTau40._(333GGGQVEVKSEKLD₃₄₆), который содержит эпитоп NI-105.4E4, выявляемый методом картирования Pepspot (аминокислоты 337-343), синтезировали при помощи Schafer-N (Copenhagen, Denmark). В С-конец добавляли дополнительный цистеин, чтобы обеспечить возможность связывания с микропланшетами для иммобилизации (Nunc, Denmark). Второй пептид, соответствующий аминокислотам 226-239 человеческого тау (₂₂₆VAVVRpTPPKSPSSA₂₃₉), содержащий когнатный эпитоп коммерчески доступного мышинового моноклонального антитела к тау AT180 (Thermo Scientific, USA), синтезировали соответствующим способом и применяли в качестве контроля.

Трансгенные мыши.

Для валидации антител к тау (и молекул, обладающих их связывающей специфичностью) согласно настоящему изобретению применяли три разных животных модели таупатий.

1. Трансгенные TauP301L мыши (линия 183): экспрессирующие человеческий Tau40 с мутацией P301L под управлением мышинового промотора Thy1.2 (получение этих трансгенных животных описано в Götz et al., J. Biol. Chem. 276 (2001), 529-534 и в международной заявке WO 2003/017918, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки).

2. JNPL3 мыши, экспрессирующие наиболее короткую изоформу человеческого тау 4R с мутацией P301L под управлением мышинового промотора PrP (доступны от Taconic, Hudson, NY, U.S.A.).

3. P301STau (линия PS19) мыши, экспрессирующие человеческий тау с мутацией P301S под управлением мышинового промотора PrP (доступны от Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A.).

Мышей из мышинных моделей таупатий и соответствующих мышей дикого типа содержали в стандартных условиях с повторяемым 12 ч: 12-ч циклом день/ночь с трехразовым доступом к пище и воде. Обрабатываемые группы были сбалансированы по возрасту и половому признаку.

Пример 1. Валидация целевой и связывающей специфичности человеческих антител к тау.

Чтобы подтвердить, что тау является распознаваемой мишенью выделенных антител, применяли метод анализа ELISA, как описано выше. Для типового рекомбинантного человеческого антитела NI-105.4A3 96-луночные микропланшеты (Costar, Corning, USA) покрывали рекомбинантным человеческим тау (hTau40, rPeptide, Bogart, USA), разведенным до концентрации 3 мкг/мл, или БСА в карбонатном покрывающем буфере ELISA (pH 9,6) и исследовали эффективность связывания антитела. Согласно данным ELISA типовое антитело NI-105.4A3 специфически связывается с человеческим тау. Для БСА связывание не наблюдали.

Для определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) типовых антител NI-105.4E4 и NI-105.24B2 проводили дополнительные эксперименты с применением прямого метода ELISA для разных концентраций антител. 96-луночные микропланшеты (Costar, Corning, USA) покрывали рекомбинантным человеческим тау (hTau40, rPeptide, Bogart, USA), разведенным до концентрации 1 мкг/мл (для анализа с применением антитела NI-105.4E4) или 3 мкг/мл (для анализа с применением антитела NI-105.24B2), в карбонатном покрывающем буфере ELISA и исследовали эффективность связывания антител. Величины EC₅₀ оценивали методом нелинейного регрессионного анализа при помощи программного обеспечения GraphPad Prism. Рекомбинантное, полученное от человека антитело NI-105.4E4, связывалось с hTau40 с высокой аффинностью в низком наномолярном диапазоне с EC₅₀, составляющей 2,4 нМ. NI-105.24B2 связывалось с hTau40 с высокой аффинностью в низком наномолярном диапазоне с EC₅₀, составляющей 6,6 нМ.

Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC₅₀) типового антитела NI-105.4A3 также определяли в экспериментах с применением прямого метода ELISA. Планшеты ELISA покрывали рекомбинантным человеческим тау (hTau40, 1 мкг/мл), PHFTau (1:100) и контрольным препаратом (1:100) и инкубировали с антителами в разных концентрациях. NI-105.4A3 связывалось с rTau с высокой аффинностью в низком наномолярном диапазоне с EC₅₀, составляющей 1,4 нМ. NI-105.4A3 связывалось с PHFTau с высокой аффинностью в низком наномолярном диапазоне с EC₅₀, составляющей 1,2 нМ.

Пример 2. Анализ связывания рекомбинантных человеческих антител с рекомбинантным тау и патологическим тау, экстрагированным из пораженного БА мозга.

Для определения связывающей способности NI-105.4E4 и NI-105.24B2 в отношении патологических видов тау, экстрагированных из пораженного БА мозга, применяли методы ДСН-ПААГ и вестерн-блоттинга, как подробно описано выше. Блоты инкубировали на протяжении ночи с первичными антителами NI-105.4E4 (человеческое), NI-105.24B2 (человеческое) или Tau12 (мышинное моноклональное антитело, Covance, California, U.S.A.), а потом - с ПХ-конъюгированным козьим анти-человеческим IgGFcy (в случае человеческого антител) или ПХ-конъюгированным козьим анти-мышинным IgG вторичным антителом.

Рекомбинантные антитела NI-105.4E4 и NI-105.24B2 распознавали рекомбинантный hTau40, а также патологически модифицированный PHFTau, экстрагированный из пораженного БА мозга согласно данным вестерн-блоттинга. Контрольное антитело Tau12 также распознавало оба вида тау.

Кроме того, как обсуждалось выше в примере 1, полумаксимальную эффективную концентрацию

(EC₅₀) типового антитела NI-105.4A3 определяли в экспериментах с применением прямого метода ELISA с применением PHFTau. NI-105.4A3 связывалось с PHFTau с высокой аффинностью в низком наномольном диапазоне с EC₅₀, составляющей 1,2 нМ.

Пример 3. Картирование связывающих NI-105.4E4 и NI-105.4A3 эпитопов на hTau40.

Пептидную матрицу из 118 пептидных последовательностей, соответствующих полноразмерному hTau40 (аминокислоты 1-441), с перекрытием в 11 аминокислот между двумя смежными пептидами отпечатывали на нитроцеллюлозной мембране (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany). Снабжение антител иммуометками, а также восстановление мембраны проводили в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы исключить неспецифическое связывание детекторного антитела, сначала проводили зондирование мембраны при помощи ПХ-конъюгированного козьего античеловеческого IgG, не используя первичное антитело. После восстановления мембрану зондировали 100 нМ рекомбинантного антитела NI-105.4E4. Связывание антитела выявляли методом ЭХЛ и ImageQuant 350 (GE Healthcare, Otelfingen, Switzerland).

Две группы смежных пептидных пятен (пептид 83, 84 и 85; пептид 96 и 97) определяли отдельно при помощи NI105.4E4 при сравнении только с детекторным антителом. Последовательности, соответствующие этим двум группам пептидов, соответствуют аминокислотам 329-351 и 387-397 hTau40. Эти данные дают основание предположить, что NI-105.4E4 распознавало прерывистый эпитоп, содержащий две линейные последовательности: одну в пределах связывающего домена R4 микротрубочки, а другую - в С-терминальном домене.

Последовательность, принадлежащая пептидам 83-85, содержит аминокислотные остатки 337-343 hTau40. Данные Pepspot (JPT) дают основание предположить, что NI-105.4E4 распознавало эпитоп hTau, который содержит аминокислоты 337-343 человеческого тау. Эта область расположена в пределах связывающего домена микротрубочки тау и является консервативной для всех нейрональных изоформ человеческого тау, а также среди других видов, включая мышей и крыс.

Так как этот домен связан с микротрубочками в случае физиологического ассоциированного с микротрубочками тау, ожидается, что NI-105.4E4 окажется специфически нацеленным на патологически релевантный пул тау, выделенный из микротрубочек.

Для определения ключевых остатков в пределах связывающих пептидов NI-105.4E4 проводили аланиновое сканирование для последовательного замещения каждого остатка аланином. Остатки аланина в оригинальной последовательности (A384 и A390) замещали пролином и глицином. Пятна 35-50 и 51-68 представляют собой оригинальные пептиды (пятно 35 и пятно 51) и их аланин-замещенные варианты. Данные аланинового сканирования дают основание предположить, что V339, E342, D387, E391 и K395 были необходимы для связывания NI-105.4E4.

Проводили дополнительный эксперимент, в котором исследовали связывание NI-105.4E4 с пептидами тау. Прямой метод ELISA показал, что NI-105.4E4 специфически распознавал пептид, соответствующий аминокислотам 333-346 hTau40, который содержит аминокислотные остатки 337-343, определенные по картированию Pepspot. В случае контрольного пептида, соответствующего эпитопу AT180, не наблюдали перекрестной реактивности NI-105.4E4. И наоборот, AT180 распознавал свой когнатный эпитоп, содержащий пептид, но не связывался со специфическим пептидом NI-105.4E4. Видоспецифические вторичные антитела не связывались ни с одним из пептидов. Прямой анализ ELISA вместе с нанесенными пептидами подтвердил, что NI-105.4E4 специфически распознавало пептид, содержащий аминокислотные остатки 337-343 человеческого тау, определенные по картированию Pepspot.

Для получения большой карты связывающих NI-105.4A3 эпитопов hTau40 получали полипептиды четырех доменов тау (домен I, домен II, домен III и домен IV тау). Фрагменты ДНК, синтезированные при помощи GeneArt® (Invitrogen), которые кодируют каждый домен тау и содержат 6xHis метку в N-конце, клонированные в экспрессионный вектор pRSET-A (Invitrogen), трансфицировали в E. Coli BL21 (DE3) (New England Biolabs). Экспрессию His-меченых доменов тау индуцировали 0,5 mM ИПТГ на протяжении 6 ч перед лизисом бактерий под действием лизозима и с разрушением ультразвуком. Лизаты кипятили на протяжении 5 мин перед проведением дополнительной очистки при помощи Ni-NTA Superflow Columns (Qiagen). Элюированные His-меченые домены тау наносили на планшеты ELISA или загружали в полиакриламидный гель для проведения вестерн-блоттинга. Эти последовательно перекрывающиеся полипептиды доменов тау соответствуют полноразмерному hTau40. Очищенные домены тау наносили на планшет ELISA и исследовали связывание NI-105.4A3. NI-105.4A3 связывается только с доменом I тау и полноразмерным hTau40, что свидетельствует о том, что эпитоп находится в пределах N-терминальной части hTau40 (ак 1-136). Данные вестерн-блоттинга подтвердили наличие специфического связывания NI-105.4A3 с доменом I тау. Картирование эпитопов NI-105.4A3 методом PepSpot (JPT) позволило определить аминокислоты Q35-Q49 человеческого Tau40. Для определения ключевых остатков в пределах эпитопа для связывания NI-105.4A3 проводили аланиновое сканирование для последовательного замещения каждого остатка аланином. Остаток аланина в оригинальной последовательности (A41) замещали глицином или пролином. Данные аланинового сканирования показали, что D40, A41 и K44 являются ключевыми остатками для связывания NI-105.4A3.

Пример 4. Оценка связывания NI-105.4E4 с физиологическими формами, а также патологическими агрегатами тау из тканей пораженного БА мозга у трансгенных в отношении человеческого тау мышей.

Нейрофибрилярные клубки (НФК), состоящие из гиперфосфорилированных филаментов тау, являются нейропатологическими отличительными признаками БА. Гиперфосфорилированные филаменты тау также являются основными компонентами дистрофических нейритов и нейропильных нитей, которые являются стандартными нейропатологическими признаками БА. Сверхэкспрессия человеческого тау, содержащего семейную тау-мутацию P301L, вызывает образование НФК у мышей в возрасте шести месяцев (Götz et al., 2001a).

Для оценки связывания рекомбинантного человеческого антитела к тау с физиологическими формами, а также патологическими агрегатами тау, проводили иммуногистологическое окрашивание пораженных БА тканей головного мозга для TauP301L трансгенных мышей типовым антителом NI-105.4E4 согласно данному изобретению.

Мышам проводили перфузию 20 мл 100 мМ Трис Cl/6 мМ ЭГТУ (pH 7,4) при комнатной температуре под глубокой анестезией. Головной мозг извлекали и на ночь погружали в 4% ПФА в ФСБ (pH 7,4) при 4°C для фиксации с последующей заливкой в парафин. В случае человеческой ткани использовали парафиновые блоки, содержащие ткани головного мозга, полученные от пораженных БА и здоровых контрольных субъектов. Окрашивание ДАБ проводили, следуя стандартным протоколам. В качестве положительного контроля использовали моноклональное мышинное антитело Tau-12 (Covance, California, U.S.A.). Также применяли ПХ-конъюгированные детекторные антитела без первичных антител.

Рекомбинантное человеческое антитело NI-105.4E4 выявило многочисленные НФК и нейропильные нити в пораженном БА мозге (фиг. 2A), которые отсутствовали в здоровом контрольном мозге (фиг. 2B). Вторичное антитело само по себе не генерировало сигналов как в пораженном БА (фиг. 2C), так и в контрольном мозге (фиг. 2D). В мозге P301L тау трансгенных мышей NI-105.4E4 прочно связывалось с патологическим тау, относящимся к НФК (фиг. 2E, F и H), нейропильными нитями (фиг. 2E и G) и дистрофическими нейритами (фиг. 2E и H). Кроме того, NI-105.4E4 также выявило агрегаты тау на стадии, предвещающей образование клубков (фиг. 2I). В мозге трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих человеческий P301L тау и человеческий БПА со Шведской и Арктической мутациями, NI-105.4E4 специфически связывалось с дистрофическими нейритами, окружающими бета-амилоидные бляшки (фиг. 2J).

Пример 5. In vivo исследования антител согласно настоящему изобретению.

Как было описано выше, исследования, проводимые на трансгенных мышинных линиях с применением активной вакцинации фосфорилированными пептидами тау, выявили снижение уровней агрегатов тау в головном мозге и замедление прогрессирования поведенческих нарушений (Sigurdsson, J. *Alzheimers Dis.* 15 (2008), 157-168; Boimel et al., *Exp. Neurol.* 224 (2010), 472-485). Однако активная вакцинация может оказаться неприменимой в случае людей, так как ожидается, что большая часть населения старшего возраста окажется невосприимчивой к вакцинации. Кроме того, может быть трудно контролировать потенциальные побочные эффекты, связанные с тау-направленным иммунным ответом. Связывающие тау молекулы согласно настоящему изобретению вследствие сходства в специфичности связывания патологических видов тау с достаточной вероятностью приведут к снижению уровней агрегатов тау в головном мозге, сходному с вышеописанными характеристиками для мышинных антител. При этом вследствие эволюционной оптимизации и созревания аффинности в иммунной системе человека антитела согласно настоящему изобретению представляют собой полезный терапевтический инструмент, так как были получены от здоровых человеческих субъектов, и с высокой вероятностью будут обладать превосходным профилем безопасности и отсутствием иммуногенности. Подтвердить наличие этих ожидаемых терапевтических эффектов можно при помощи методов исследования, описанных в вышеупомянутых экспериментах с мышинными антителами. В частности, исследуемые антитела можно применять разными возможными способами в отношении животных, например путем внутрибрюшинной инъекции антител, внутримозговой инъекции, интравентрикулярной инфузии в головной мозг, и исследовать в отношении лечебных эффектов. Любые из вышеупомянутых возможных применений также можно использовать после или перед инъекцией бета-амилоидных препаратов в головной мозг трансгенных в отношении тау мышей для оценки лечебных эффектов на индуцированную бета-амилоидом тау-патологию.

Оценку лечебных эффектов можно проводить гистохимическими методами, включающими количественную оценку Gallyas-положительных клеток, общего окрашивания человеческого тау, нагрузки фосфорилированным тау в головном мозге и/или биохимическое определение растворимого и нерастворимого тау в головном мозге и уровней фосфор-тау после экстракции мозга. Кроме того, можно провести исследование поведения обрабатываемых мышей, например изменения условно-рефлекторного отвращения к пище или изменения контекстуального условно-рефлекторного замирания, для подтверждения терапевтического эффекта антител согласно настоящему изобретению (Pennanen, *Genes Brain Behav.* 5 (2006), 369-79, Pennanen *Neurobiol Dis.* 15 (2004), 500-9).

Пример 6. Характеристики антител NI-105.4E4 и NI-105.4A3 с константными доменами мышинного IgG2a.

Чтобы получить антитела со сниженной иммуногенностью для применения в изучении долговременного лечения, получали химерные мышинные версии антител NI-105.4E4 и NI-105.4A3 при помощи

технологии рекомбинантных ДНК. Для этих химерных антител выбрали мышинный изотип IgG2a/лямбда, чтобы получить молекулу, которая с высокой аффинностью связывается с мышинными Fc-гамма рецепторами и, следовательно, способна индуцировать ответ иммунных эффекторов. Аминокислотные последовательности конструкций тяжелой и легкой цепи химерного NI-105.4E4 ("ch4E4") и химерного NI-105.4A3 ("ch4A3") приведены ниже.

Таблица 5

**Аминокислотные последовательности химерного
NI-105.4E4 (ch4E4) и химерного NI-105.4A3 (ch4A3)**

тяжелая цепь зрелого ch4E4 (мышинный IgG2a) SEQ ID NO: 20	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFI SAIH WVRQASGKGLEWVGR IRSKSHNYATLYAASLKGRTLSRDDSRNTAYLQMSLQTEDMAVYYCTV LSANYDTFDYWGQGTLLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGGSVTLGCLV KGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS ITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FP PK IKDVLMI SL SPIVTCVVDVSEDDPDVQISW FV NNVEVHTAQ TQ THREDY NSTLRVVSALPIQH Q DMWSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEP VLSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG K
легкая цепь зрелого ch4E4 (мышинная лямбда-цепь) SEQ ID NO: 21	SYELTQPPSVSVSPGQTARISCFGDTLPKQYTYWYQQKPGQAPVLIYKD TERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCLSDNSATWVFGG GTKVTVLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWK VDGTPVTQGMETTPSKQSN NY MASSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEG HTVEKSLSRADCS

Пример 7. Удаление консенсусного N-связанного участка гликозилирования из тяжелой цепи ch4E4 (мышинного IgG2a).

Определяли консенсусный N-связанный участок гликозилирования в CDR1-области тяжелой цепи NI-105.4E4. После экспрессии в клетках млекопитающих (CHO) прогнозируемый участок N-гликозилирования (Asn-30) оказался полностью замещенным гликаном, о чем свидетельствуют данные масс-спектрометрии. Чтобы устранить N-гликозилирование в этой области и снизить гетерогенность продукта, Asn-30 тяжелой цепи ch4E4 заменяли на Gln (табл. 4). При получении и очистке из клеток CHO модифицированное антитело связывалось с рекомбинантным тау с в ~4 раза большей кажущейся аффинностью связывания по сравнению с оригинальным гликозилированным антителом.

Таблица 6

**Аминокислотные последовательности тяжелой цепи зрелого ch4E4(N30Q)
(мышинный IgG2a). Замещенный на Gln остаток выделен жирным и подчеркиванием**

тяжелая цепь зрелого ch4E4(N30Q) (мышинный IgG2a) SEQ ID NO: 22	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNF Q ISAIHWVRQASGKGLEWVGR IRSKSHNYATLYAASLKGRTLSRDDSRNTAYLQMSLQTEDMAVYYCTV LSANYDTFDYWGQGTLLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGGSVTLGCLV KGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS ITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FP PK IKDVLMI SL SPIVTCVVDVSEDDPDVQISW FV NNVEVHTAQ TQ THREDY NSTLRVVSALPIQH Q DMWSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEP VLSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG K
--	--

Пример 8. Получение агликозилированного химерного NI-105.4E4(N30Q) (ch4E4(N30Q) mIgG1 Agly).

Получали мышинный химерный агликозилированный вариант NI-105.4E4 ("ch4E4(N30Q) IgG1-Agly") из зародышевой линии, чтобы оценить взаимосвязь между эффекторной функцией антитела и активностью. В случае тяжелой цепи (SEQ ID NO: 214) варибельный домен NI-105.4E4(N30Q) (SEQ ID NO: 43) сливали с константной областью тяжелой цепи мышинного IgG1, содержащего мутацию с замещением Asn на Gln для удаления консенсусного Fc-участка гликозилирования. Варибельная область тяжелой цепи содержала изменение N30Q для удаления консенсусного участка N-гликозилирования в CDR1 (пример 7). Легкая цепь представляла собой вышеописанную легкую лямбда-цепь ch4E4 (SEQ ID NO: 21).

Пример 9. Изучение "острого" проникновения человеческого 4E4 и 4A3 в головной мозг.

Человеческие антитела NI-105.4E4 и NI-105.4A3 из зародышевой линии получали путем временной трансфекции клеток CHO и очищали методом аффинной очистки. Проводили контроль уровней эндотоксинов, которые все составляли менее 1 ЕЭ/мг. Таур301L мышам проводили внутрибрюшинную инъекцию 30 мг/кг антитела NI-105.4E4 (n = 7), 4A3 (n = 7) или такого же объема ФСБ (n = 7) на 1 и на 4 дни. На 5 день мышам под анестезией проводили перфузию ФСБ, содержащего 1 единицу/мл гепарина. Образцы крови, головного и спинного мозга брали для анализа. Правую полусферу мозга замораживали при -80°C, левую полусферу и спинной мозг фиксировали в 10% нейтрализованном формалине при 4°C на протяжении двух дней перед заливкой в парафиновый блок и препарированием. Плазму крови хранили при -80°C в аликвотах.

Экстракция белков головного мозга.

Замороженную правую полусферу взвешивали и гомогенизировали в 5 об. (5 мл/г влажной ткани) раствора, содержащего 50 мМ NaCl, 0,2% диэтиламин, ингибиторы протеаз (Roche Diagnostics GmbH) и ингибитор фосфатаз (Roche Diagnostics GmbH). Затем образцы переносили в поликарбонатные пробирки и добавляли еще 5 об. раствора для гомогенизации и выдерживали на льду на протяжении 30 мин. После центрифугирования при 100000 g, 4°C на протяжении 30 мин собирали растворимую фракцию. Эту растворимую фракцию применяли в анализе человеческого IgG. Осадок перерастворяли в 3 об. ФСБ с ингибиторами протеаз и фосфатаз. После центрифугирования при 16000 g, 4°C на протяжении 30 мин супернатант и осадок хранили отдельно при -80°C для дальнейшей экстракции нерастворимого тау. Экстракцию осадка проводили при помощи экстракции модифицированным саркозилем (Goedert M., Spillantini M.G., Cairns N.J., Crowther R.A. *Neuron* 8,159 (1992)).

Специфический в отношении человеческого IgG "сэндвич"-ELISA анализ: 2 мкг/мл козьего античеловеческого IgG Fab (Jackson) в 50 мМ карбонатном покрывающем буфере ELISA (pH 9,6) применяли в качестве захватывающего антитела. 96-луночные микропланшеты с половинным объемом лунок покрывали 30 мкл/лунку захватывающего антитела при 4°C на протяжении ночи. Затем планшет 4 раза промывали ФСБ, содержащим 0,1% Твин 20, перед инкубацией с 50 мкл/лунку ФСБ, содержащим 2% БСА, при комнатной температуре на протяжении 1 ч. Растворимые фракции экстрактов из головного мозга, образцы плазмы крови и стандартное антитело (4A3) разводили в ФСБ, содержащем 2% БСА и 0,1% Твин 20. В каждую лунку добавляли по 30 мкл разведенных образцов и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 1 ч. Затем планшет четыре раза промывали 200 мкл/лунку ФСБ, содержащего 0,1% Твин 20, перед инкубацией с ПХ-конъюгированным ослиным античеловеческим Fcγ (Jackson, разведенным в соотношении 1:10000 ФСБ, содержащим 2% БСА и 0,1% Твин 20) при комнатной температуре на протяжении 1 ч. Затем планшет четыре раза промывали 200 мкл/лунку ФСБ, содержащего 0,1% Твин 20, перед добавлением 20 мкл/лунку ТМБ (1:20 в 10 мМ цитратном растворе, pH 4,1). Затем реакцию останавливали путем добавления в каждую лунку по 10 мкл 1 М H₂SO₄. Стандартную кривую для антител получали методом серийных разведений NI-105.4A3. Концентрации антител в образцах плазмы крови и головного мозга рассчитывали в соответствии со стандартом. Затем уровень человеческого IgG в мозге пересчитывали в мкг антитела/грамм свежей ткани мозга (положив 1 г/10 мл), как указано на фиг. 6.

Высокие уровни человеческого IgG были выявлены в плазме крови всех обрабатываемых NI-105.4E4 и NI-105.4A3 мышей. В противоположность этому, в плазме крови обрабатываемых ФСБ мышей не было выявлено человеческого IgG (фиг. 5). Существенное количество человеческого IgG было выявлено в гомогенатах мозга обрабатываемых 4E4 и 4A3 мышей (фиг. 6).

Пример 10. Долговременное исследование химерного NI-105.4E4 и NI-105.4A3.

Химерные NI-105.4E4 и NI-105.4A3, содержащие варибельные домены оригинального человеческого антитела и константные области мышинного IgG2a, можно получить путем временной трансфекции клеток СНО и очистки методом аффинной очистки. Уровни эндотоксинов в каждой группе антител должны контролироваться и составлять менее 1 ЕЭ/мг. Сбалансированным по половому признаку TauP301L мышам возрастом 7,5-8 месяцев проводят внутрибрюшинную инъекцию 10, 3 мг/кг раствора антител или соответствующего объема контрольного ФСБ. В каждой обрабатываемой группе содержится 20-25 мышей. Обработку проводят один раз в неделю на протяжении 26 недель. В альтернативном варианте обработку проводят два раза в неделю на протяжении 13 недель. Массу тела измеряют каждые две недели. В конце периода обработки мышам под анестезией проводят перфузию. Собирают образцы головного и спинного мозга и крови. Половину головного и спинного мозга можно фиксировать в 10% формалине на протяжении трех дней перед заливкой в парафиновый блок. Срезы толщиной в 4-6 мкм, полученные из этих тканевых блоков, можно использовать для проведения иммуногистохимических исследований. Другую половину головного мозга взвешивают и глубоко замораживают при -80°C для биохимического анализа.

Действие лекарственного препарата оценивают, сравнивая уровень нейрофибриллярных клубков (НФК) и уровень тау с разными характеристиками растворимости для обрабатываемых и контрольных образцов. НФК можно визуализировать методом импрегнации серебром по Gallyas (F Gallyas *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung* 19.1 (1971)) или методом иммуноокрашивания моноклональным мышинным антителом AT100 и AT180, которое распознает патологически фосфорилированный тау в НФК. Для оценки эффекта обработки антителом можно определить количество или частоту появления Gallyas-положительных нейронов и/или AT100, AT180-меченых нейронов в головном и спинном мозге обрабатываемых антителом мышей и контрольных животных.

Растворимый и нерастворимый тау можно экстрагировать, следуя описанному в данном документе протоколу экстракции белков головного мозга. В альтернативном варианте растворимый и нерастворимый тау можно экстрагировать при помощи экстракции модифицированным саркозилем (Goedert M., Spillantini M.G., Cairns N.J., Crowther R.A. *Neuron* 8,159(1992)). Вкратце, замороженный мозг гомогенизируют в 10 об. (мас./об.) 10% буфера, содержащего гомогенат цукрозы и состоящего из 10 мМ Трис-HCl (pH 7,4), 0,8 М NaCl, 1 мМ ЭГТУ, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF, 1 мМ АЭБСФ, ингибиторов протеаз (Roche

Diagnostics GmbH) и ингибитора фосфатазы (Roche Diagnostics GmbH). Гомогенат центрифугируют на протяжении 20 мин при 20000 g и сохраняют супернатант. Осадок гомогенизируют в 10 об. гомогенизационного буфера и центрифугируют второй раз. Супернатанты можно объединить и добавить N-лаурилсаркозинат (Sigma) до конечной концентрации 1% (мас./об.) и инкубировать при 37°C с перемешиванием при 300 об/мин на протяжении 1,5 ч с последующим центрифугированием при 100000 g на протяжении 1 ч. Супернатант собирают в виде растворимой саркозил-фракции, а осадок, состоящий из 1 г ткани мозга, перерастворяют в 0,2 мл 50 mM Трис-HCl (pH 7,4) в виде PHF-фракции.

Уровни растворимого и нерастворимого тау определяют при помощи коммерчески доступных наборов для тау ELISA (Invitrogen). Кроме того, экстракты белков головного мозга разделяют при помощи 4-12% Бис-Трис ДСН-ПААГ с последующим иммуноблоттингом с антителами к Tau12 (человеческому тау), AT8 (pS202/pT205), AT100 (pT212/pS214), AT180 (pT231) и E178 (pS396). Проводят полуколичественный анализ с измерением общей плотности каждого образца против стандартов с известным содержанием тау.

Кроме того, как указано выше в примере 5, можно проводить исследования поведения. Например, улучшение кратковременной памяти у обрабатываемых антителом TauP301L мышей можно исследовать при помощи задачи с прохождением Y-лабиринта с двумя испытаниями (например, Pennanen, Genes Brain Behav. 5 (2006), 369-79, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки). Длина трех рукавов лабиринта составляет 22 см, ширина - 5 см и глубина - 15 см. На черной шторке, окружающей лабиринт, размещены черные и белые абстрактные метки. Эксперименты проводят при уровне освещенности, составляющем 6 лк во время темной фазы. Каждый эксперимент включает в себя сеанс обучения и сеанс наблюдения. Во время сеанса обучения мышей направляют в два из трех рукавов (стартовый рукав и второй рукав), которые можно свободно исследовать на протяжении 4 мин, при этом доступ в третий рукав закрыт (новый рукав). Затем мышей забирают из лабиринта и держат в клетке на протяжении 1,5-5 мин, пока лабиринт тщательно очищают 70% этанолом для удаления каких-либо обонятельных меток. Затем мышей на 4 мин. помещают обратно в лабиринт с доступом ко всем трем рукавам для наблюдения. Записывают последовательность заходов, количество заходов в каждый рукав и время, проведенное в каждом рукаве. По этим данным рассчитывают соотношение времени, проведенного в новом третьем рукаве, и среднего времени, проведенного в двух других рукавах (стартовом рукаве и втором рукаве), и сравнивают для разных обрабатываемых групп в мышинной модели таупатии и соответствующих контрольных мышей дикого типа. Как правило, грызуны предпочитают обследовать новый рукав лабиринта, а не возвращаться в один из тех, где они побывали до этого. Влияние антител можно отслеживать по восстановлению этого предпочтения со стороны обрабатываемых мышей из модели таупатии по сравнению с недискриминативным поведением необработанных мышей вследствие нарушения у них кратковременной памяти, связанного с заболеванием. Следовательно, соотношение, близкое к 1, указывает на нарушение кратковременной памяти. Более высокое соотношение указывает на лучшую кратковременную память. Считается, что нарушение кратковременной памяти у TauP301L мышей происходит из-за тау-патологии, возникающей вследствие сверхэкспрессии человеческого тау. Следовательно, более высокое соотношение, наблюдаемое для обрабатываемых анти-тау антителами TauP301L мышей, по сравнению с контрольными TauP301L мышами будет свидетельствовать о том, что анти-тау антитело имеет терапевтический эффект на тау-патологию.

Пример 11. Определение человеческих анти-тау антител.

Рекомбинантные человеческие антитела к тау NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6 и NI-105.9C4 выделяли в соответствии с описанными в данном документе способами. Нацеливание и специфичность связывания этих человеческих антител к тау подтверждали так, как описано выше. Обобщенные результаты приведены в табл. 5. Все применяемые антитела, за исключением NI-105.17C1, были из зародышевой линии.

Таблица 7

In vitro характеристики человеческих анти-тау антител

Антитело	EC ₅₀ [нМ]/гTau ELISA	EC ₅₀ [нМ]/ PHFTau ELISA	Область связывания (hTau40)*	Необходимость фосфорилирования**
NI-105.6C5	0,033	0,04	125-131	Нет
NI-105.17C1	3,3	4,7	397-441	Нет
NI-105.40E8	>100	0,133	226-244	Да, pS235
NI-105.6E3	>100	18,7	Нет данных	Да
NI-105.29G10	3,8	5,3	217-227	Нет
NI-105.48E5	>500	13,2	37-55; 387-406	pS396, pS46 не подтверждено
NI-105.26B12	2,9	>90	421-427	Нет данных
NI-105.6L9	2,5	>60	427-439	Нет данных
NI-105.12E12	28,6	>150	1-158	Нет данных
NI-105.60E7	0,18	-	197-207	Фосфорилирование в 198, 199, 202 или 205 нарушает связывание
NI-105.14E2	0,65	-	57- 67	Нет
NI-105.39E2	0,7	-	355-441	Нет данных
NI-105.19C6	4,0	-	313-319	Нет
NI-105.22E1	1,1	>200	309-319	Нет
NI-105.9C4	5,2	-	221-231	pS231 нарушает связывание

* - Область связывания hTau40 определяли путем комбинации подходов Rep-SPOTs, вестерн-блоттинга фрагментов тау и ELISA, ELISA для тау-пептида и аланинового сканирования;

** - необходимость для связывания антитела фосфорилирования в определенных аминокислотах белка тау подтверждали путем сравнения связывания антитела с гTau, PHFTau, дефосфорилированным телячьей кишечной фосфатазой PHFTau, гTau, in vitro фосфорилированным GSK3β или GSK3β/CDK5/p35 и фосфорилированными пептидами тау методом RepSPOTs и прямым ELISA.

Пример 12. Химеризация человеческих антител с константными доменами мышинового IgG2a.

Чтобы получить антитела со сниженной иммуногенностью для применения в изучении долговременного лечения, получали химерные мышинные версии антител NI-105.17C1 ("ch17C1"), NI-105.6C5 ("ch6C5"), NI-105.40E8 ("ch40E8") и NI-105.6E3 ("ch6E3") при помощи технологии рекомбинантных ДНК. Для этих химерных антител выбрали мышинный изотип IgG2a/лямбда, чтобы получить молекулу, которая с высокой аффинностью связывается с мышинными Fc-гамма рецепторами и, следовательно, способна индуцировать ответ иммунных эффекторов. Аминокислотные последовательности конструкций тяжелой и легкой цепи ch17C1, ch6C5, ch40E8, ch40E8(R104W) и ch6E3 приведены ниже.

тяжелая цепь ch17C1 (мышинный IgG2a)	SEQ ID NO:203
легкая цепь ch17C1 (мышинная лямбда-цепь)	SEQ ID NO:204
тяжелая цепь ch6C5 (мышинный IgG2a)	SEQ ID NO:205
легкая цепь ch6C5 (мышинная лямбда-цепь)	SEQ ID NO:206
тяжелая цепь ch40E8 (мышинный IgG2a)	SEQ ID NO:207
тяжелая цепь ch40E8(R104W) (мышинный IgG2a)	SEQ ID NO:208
легкая цепь ch40E8 (лямбда-цепь)	SEQ ID NO:209
тяжелая цепь ch6E3 (мышинный IgG2a)	SEQ ID NO:210
легкая цепь ch6E3 (мышинная каппа-цепь)	SEQ ID NO:211

Пример 13. Удаление участка гликозилирования CDR в легкой цепи NI-105.17C1.

Определяли консенсусный участок N-связанного гликозилирования в CDR1-области легкой цепи NI-105.17C1. После экспрессии в клетках млекопитающих (CHO) прогнозируемый участок N-гликозилирования (Asn-31) оказался полностью замещенным гликаном, о чем свидетельствуют данные масс-спектрометрии. Чтобы устранить N-гликозилирование в этой области и улучшить гетерогенность продукта, Asn-31 легкой цепи ch17C1 заменяли на Gln (см. последовательность ниже). При получении и очистке из клеток CHO модифицированное антитело (ch17C1(N31Q) mIgG2a) связывалось с рекомбинантным тау со сходной с оригинальным гликозилированным антителом кажущейся аффинностью связывания (см. фиг. 8A). Варибельная область легкой цепи NI-105.17C1(N31Q) содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 221.

легкая цепь ch17C1(N31Q) (мышинная лямбда-цепь)	SEQ ID NO:212
человеческая NI-105.17C1(N31Q) VL	SEQ ID NO:221

Пример 14. Получение антител со сниженной эффекторной функцией.

Получали варианты антител, содержащие мутации в пределах консенсусного участка N-гликозилирования в Fc-доме тяжелой цепи. Эти варианты, обозначаемые "Agly", были сконструированы для получения анти-тау антител со сниженной функцией иммунных эффекторов. Аминокислотные последовательности Agly-вариантов антител к тау приведены ниже.

тяжелая цепь ch4A3-mIgG1-Agly	SEQ ID NO:213
тяжелая цепь ch4E4(N30Q)-mIgG1-Agly	SEQ ID NO:214
тяжелая цепь ch6C5-mIgG1-Agly	SEQ ID NO:215
тяжелая цепь ch17C1-mIgG1-Agly	SEQ ID NO:216

Пример 15. Сравнение связывающей активности ch17C1-mIgG2a и ch17C1-mIgG-Agly.

Для ch17C1 Agly оценивали взаимосвязь между эффекторной функцией антитела и активностью (фиг. 8A). Антитело ch17C1 содержит тяжелую цепь ch17C1 (SEQ ID NO: 203) и легкую цепь ch17C1 (SEQ ID NO: 204). Антитело ch17C1(N31Q) mIgG2a содержит тяжелую цепь ch17C1 (SEQ ID NO: 203) и легкую цепь ch17C1(N31Q) (SEQ ID NO: 212), в CDR1 которой введена мутация N31Q для удаления участка гликозилирования CDR. Антитело ch17C1(N31Q) mIgG1Agly содержит тяжелую цепь ch17C1-mIgG1-Agly (SEQ ID NO: 216), в которой вариабельные домены 17C1 слиты с тяжелой цепью мышиного IgG1, содержащей мутацию с замещением Asp на Gln в позиции 294 (остаток 297 согласно Кабату) для удаления консенсусного Fc-участка гликозилирования, и легкую цепь ch17C1(N31Q) (SEQ ID NO: 212). При получении и очистке из клеток CHO ch17C1(N31Q) mIgG1 Agly связывалось с рекомбинантным тау со сходной с оригинальным гликозилированным антителом кажущейся аффинностью связывания (см. фиг. 8A).

Пример 16. Сравнение валина и изолейцина в позиции 48 легкой цепи 17C1.

В процессе получения химерной мышиной IgG2a версии антитела NI-105.17C1 из зародышевой линии проводили замену остатка 48 легкой цепи с валина на изолейцин. Чтобы подтвердить, что эта замена не влияет на связывающую способность NI-105.17C1, получали химерную мышиную IgG2a версию NI-105.17C1 с валином в позиции 48. При получении и очистке из клеток CHO антитело ch17C1(N31Q, I48V) mIgG2a связывалось с рекомбинантным тау со сходной с ch17C1(N31Q) mIgG2a кажущейся аффинностью связывания (см. фиг. 8B). Антитело ch17C1(N31Q) mIgG2a содержит тяжелую цепь ch17C1 (SEQ ID NO: 203) и легкую цепь ch17C1(N31Q, I48V) (SEQ ID NO: 217).

легкая цепь ch17C1(N31Q, I48V) (мышиная лямбда-цепь)	SEQ ID NO:217
человеческая NI-105.17C1(N31Q, I48V) VL	SEQ ID NO:222

Пример 17. Сравнение аргинина и триптофана в позиции 104 NI-105.40E8.

Антитело NI-105.40E8, которое является избирательным в отношении фосфорилированной формы тау, обнаруживаемой в человеческих спаренных спиральных филаментах (PHF), содержит нестандартный остаток аргинина в позиции 104 NI-105.40E8 VH. Как правило, в пределах набора человеческих иммуноглобулинов эту позицию занимает триптофан. Получали такую форму тяжелой цепи NI-105.40E8, NI-105.40E8(R104W)-hIgG1, в которой остаток Arg104 был замещен триптофаном. При получении и очистке из клеток CHO антитело NI-105.40E8(R104W)-hIgG1 связывалось с человеческим PHF-тау со сходной с NI-105.40E8-hIgG1 кажущейся аффинностью связывания (см. фиг. 9). Легкие цепи обоих антител были идентичны.

тяжелая цепь человеческого NI-105.40E8(R104W)-hIgG1	SEQ ID NO:218
легкая цепь человеческого NI-105.40E8 (человеческая лямбда)	SEQ ID NO:219
человеческая NI-105.40E8(R104W) VH	SEQ ID NO:220

Пример 18. Человеческие анти-тау антитела связываются с патологически агрегированным тау в пораженном БА мозге и мозге животных из трансгенной мышиной модели таупатии.

Образцы тканей головного мозга, полученные от пациентов с болезнью Альцгеймера и контрольных пациентов, а также из мозга трансгенных в отношении таупатии мышей и контрольных животных дикого типа, окрашивали человеческими анти-тау антителами из зародышевой линии, предложенными в данном документе. Репрезентативные изображения связывания человеческих антител NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6C5 из зародышевой линии и анти-тау антитела NI-105.17C1 с патологическими агрегатами тау в пораженном болезнью Альцгеймера (БА) мозге и в мозге трансгенных в отношении таупатии мышей (Тг) показаны на фиг. 10. Ни одно из этих антител не связывалось с нормальным тау в мозге умственно здорового субъекта (Ктр) или мышцы дикого типа (Дт). Разница в изображениях, полученных для этих антител, отражает разницу в их специфичности в отношении эпитопов и аффинности связывания.

Пример 19. Проникновение антител в мозг TauP301L мышей.

Животные и обработка антителами: Человеческие анти-тау антитела NI-105.6C5, NI-105.40E8 и NI-105.6E3 получали путем временной трансфекции клеток CHO и очищали стандартными методами. В качестве изотипического контроля использовали гуманизированное антитело, не обладающее перекрестной реактивностью в отношении мышинных антигенов (hIgG1). В первом эксперименте половину инъектируемых антител NI-105.6C5, NI-105.6E3 и hIgG1 метили Cy3 (GE Healthcare, PA13105) с приблизительным соотношением антитело:Cy3, составляющим 1:3. Внесение Cy3-меток не изменяло связывание антитела, что подтверждали методом ELISA и иммуноокрашиванием в TauP301L мозге (данные не показаны). Во втором эксперименте применяли немеченые анти-тау антитела NI-105.6C5 и NI-105.40E8.

TauP301L мыши возрастом 18-22 месяцев получали две дозы по 30 мг/кг NI-105.6C5, NI-105.6E3 или контрольного hIgG1 человеческого изотипа IgG1 путем в.б. инъекции в пределах семи дней. Образцы ткани брали у трех мышей из каждой обрабатываемой группы во временные точки, соответствующие 1, 8 и 22 дням после второго дозирования. Во втором эксперименте TauP301L мышей инъектировали в.б. 30 мг/кг h40E8 и h6C5 дважды в пределах семи дней, а образцы ткани у этих мышей брали через один день после второй инъекции.

Для сбора образцов тканей мышей глубоко анестезировали кетамин/ксилазином перед сбором крови через правое предсердие. Затем собирали ЦСЖ путем пункции мозжечково-мозговой цистерны. Головной и спинной мозг последовательно извлекали после перфузии на протяжении 2 мин охлажденным до температуры заморозки ФСБ, содержащим 10 ОЕ/мл гепарина, и на протяжении 5 мин - 10% нейтрализованным формалином через левый желудочек. Головной мозг фиксировали в 10% нейтрализованном формалине на протяжении еще 3 ч при 4°C с последующим погружением в 30% цукрозу на протяжении 48 ч. Затем мозг замораживали на сухом льду и после этого разрезали на группы 30 мкм коронарных срезов. До применения группы срезов хранили при -20°C в растворе антифриза, содержащем 1 М глюкозы, 37,5% этиленгликоль в 50 мМ содержащем фосфат натрия буфере, pH 7,4, с 0,025% азидом натрия. Спинной мозг фиксировали в 10% нейтрализованном формалине на протяжении двух дней и заливали в парафиновые блоки.

Иммуногистохимия.

Коронарные срезы толщиной 30 мкм зондировали биотинилированным ослиным античеловеческим IgG (H+L) путем окрашивания свободно плавающих срезов. Свободно плавающие срезы промывали в Трис-Тритон, pH 7,4 (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 0,05% Тритон X-100), инкубировали в 1% H₂O₂ ФСБ на протяжении 30 мин и инкубировали с блокирующим раствором, содержащим 2% нормальную козью и лошадиную сыворотку в Трис-Тритон с дополнительным 0,2% Тритон X-100 на протяжении 1 ч при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали с биотинилированным ослиным античеловеческим IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Labs, 709-065-149) при 1:200 в блокирующем растворе на протяжении 16 ч при 4°C с перемешиванием при 100 об/мин для выявления нейронального человеческого IgG. Связанное с тканью биотинилированное антитело визуализировали посредством хромогенной реакции пероксидазы при помощи устройства Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, PK6100, 1:100). Ферментативную реакцию останавливали охлаждением до температуры заморозки ФСБ и промывали срезы в ФСБ 3 раза. Затем срезы помещали на препаратные стекла и высушивали на воздухе на протяжении ночи перед проведением контр-окрашивания раствором гемалюма для визуализации ядер (Carl Roth GmbH + Co., T865.1). После проведения этапов дегидратации препараты закрывали покровными стеклами перед сканированием при помощи виртуальной системы микроскопии Olympus dotSlide 2.1.

Человеческие антитела выявляли в головном мозге TauP301L мышей, которые получали человеческие анти-тау антитела или контрольное антитело hIgG1 путем в.б. инъекции, но не выявляли в случае TauP301L мышей и мышей дикого типа, не проходивших обработку антителами (фиг. 11). При этом нейрональное окрашивание наблюдали только в гиппокампе мышей, обработанных анти-тау антителами NI-105.6C5, NI-105.6E3 и NI-105.40E8, но не в случае обработанных hIgG1 мышей. Нейрональное окрашивание анти-тау антителами было легко выявляемо через 1 день после инъекции, менее выражено через 8 дней после инъекции и не выявляемо через 22 дня после инъекции (данные не показаны). TauP301L мыши вырабатывали высокие уровни трансгенного человеческого тау в гиппокампальной формации, а гиппокамп является одним из участков, где раньше всего происходит образование нейрофибриллярных клубков. Таким образом, инъектируемые периферическим путем анти-тау антитела не только попадали в головной мозг, но также с большой вероятностью попадали в нейроны, которые содержали высокие уровни тау.

Пример 20. Влияние долговременной обработки TauP301L мышей ch4E4(N30Q) и ch17C1(N31Q).

Животные и обработка антителами.

Химерное NI-105.4E4(N30Q) ("ch4E4(N30Q)") и химерное NI-105.17C1(N31Q) ("ch17C1(N31Q)"), содержащие вариабельные домены человеческого антитела и константные области мышиного IgG2a, получали путем временной трансфекции клеток CHO и очищали стандартными методами.

Сбалансированные по половому признаку TauP301L мыши возрастом 7,5-8 месяцев еженедельно получали 10 мг/кг ch17C1(N31Q) (n = 20), 10 мг/кг ch4E4(N30Q) (n = 20) или такой же объем ФСБ (n = 20) путем внутрибрюшинной инъекции. Массу тела определяли каждые две недели. Существенной поте-

ри массы не наблюдали. Две мыши из ФСБ-группы и одна мышь из обрабатываемой ch17C1(N31Q) группы умерли преждевременно. Через один день после 25-й обработки мышей анестезировали для сбора образцов тканей. Кровь брали через орбитальный синус. Головной и спинной мозг последовательно изымали после перфузии на протяжении 2 мин охлажденным до температуры заморозания ФСБ, содержащим 10 ОЕ/мл гепарина, через левый желудочек. Затем левую половину головного мозга взвешивали, глубоко замораживали в сухом льду и хранили при -80°C до применения. Правую половину головного мозга и спинной мозг фиксировали в нейтрализованном 10% формалине при 4°C на протяжении двух дней с последующим хранением в ФСБ перед получением залитых в парафин блоков, содержащих головной и спинной мозг.

Экстракция белков головного мозга.

Белки головного мозга последовательно экстрагировали на основе растворимости. Левую половину мозга сначала гомогенизировали в 10-кратном количестве м/об. 50 mM NaCl, содержащего 0,2% диэтиламин, 1X ингибитора протеаз (Roche Diagnostics GmbH) и 1X ингибитора фосфатаз (Roche Diagnostics GmbH). После 30 мин инкубации на льду гомогенат центрифугировали при 100000 g при 4°C на протяжении 30 мин. После этого собирали супернатант и определяли его как растворимую фракцию. Оставшийся осадок гомогенизировали в 12-кратном количестве м/об. 10% содержащего цукрозу лизисного буфера, содержащего 10 mM Трис, pH 7,4, 0,8 M NaCl, 1 mM ЭГТУ, 1X ингибитора фосфатаз, 1X ингибитора протеаз, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF и 1 mM АЭБСФ. После 30 мин инкубации на льду гомогенат центрифугировали при 20500 g при 4°C на протяжении 20 мин. 95% супернатанта тщательно собирали для экстракции саркозилем. Осадок хранили при -80°C . В супернатант добавляли N-лаурилсаркозинат (до 1% (м/об.) конечной концентрации). Через 1 ч инкубации при 37°C с перемешиванием при 220 об/мин раствор центрифугировали при 100000 g при 4°C на протяжении 1 ч. Супернатант собирали и определяли его как саркозил-растворимую фракцию. Осадок оставляли для высыхания при комнатной температуре на протяжении 30 мин, затем растворяли в 50 mM Трис, pH 7,4 (20% об/м от исходной массы мозга) и определяли его как РНФ-нерастворимую фракцию, которую хранили при -80°C до применения.

Измерения методом ELISA.

Проводили количественную оценку общего человеческого тау и фосфорилированного тау в трех фракциях белков головного мозга при помощи коммерческих наборов для ELISA (Life Technologies), следуя протоколу производителя. Определяли общий человеческий тау, человеческий тау, фосфорилированный в треонине 231 (pT231 тау), человеческий тау, фосфорилированный в серине 199 (pS199 тау), человеческий тау, фосфорилированный в треонине 181 (pT181 тау). Образцы растворимой фракции стандартизировали до 1 мг/мл на основе общего содержания белка, определенного методом анализа содержания белков с применением БХК (Pierce), с 50 mM Трис, pH 7,4. Готовили аликвоты стандартизированных образцов для проведения измерений методом ELISA и вестерн-блоттинга. Для получения растворенной РНФ-нерастворимой фракции для ELISA 10 мкл РНФ-тау инкубировали с 10 мкл 8 M гидрохлорида гуанидина при комнатной температуре на протяжении 1 ч с последующим добавлением 180 мкл 50 mM Трис, pH 7,4. Измерения методом ELISA проводили, следуя стандартным протоколам. Для конечного анализа измеренные методом ELISA уровни тау в каждом образце нормировали относительно исходной массы головного мозга.

Конечные уровни лекарственного препарата в плазме крови определяли при помощи "сэндвич"-ELISA. Вкратце, 3 мкг/мл гТau (rPeptide) (SEQ ID NO: 6) в 100 nM карбонатном покрывающем буфере ELISA (pH 9,6) инкубировали в планшетах ELISA с половинным объемом от Costar при 4°C на протяжении ночи. Планшеты блокировали 3% БСА в ФСБ при комнатной температуре на протяжении 1 ч. Образцы плазмы разводили в 3% БСА в ФСБ, содержащем 0,1% Твин®20, до 1:200, 1:400 и 1:800. Серийные разведения ch17C1(N31Q) и ch4E4(N30Q) использовали для построения стандартных кривых. После 1 ч инкубации планшеты 4 раза промывали ФСБ, содержащим 0,1% Твин®20, с последующей 1-часовой инкубацией с ослиным антимышиным IgGfcy-PIX (1:10000). После промывания проводили дополнительное определение для связанного антитела стандартным колориметрическим методом. Стандартные кривые генерировали подбором сигмоидальной кривой при помощи GraphPad Prism 5.

Вестерн-блоттинг.

Образцы белков из трех фракций нагревали при 70°C на протяжении 10 мин в 4X NuPAGE® LDS буфере для образцов (Life Technologies), а для такого же количества общего белка из каждого образца проводили электрофорез в NuPAGE® 4-12% (м/об.) геле. После переноса полусухого белка на ПВДФ-мембрану, мембрану блокировали в 3% БСА, содержащим 0,1% Твин-20 в ТБС, и после этого зондировали разными анти-тау антителами при 4°C на протяжении ночи. Затем конъюгированные с пероксидазой вторичные антитела инкубировали при комнатной температуре на протяжении 1 ч с последующими 4 промываниями ТБСТ. После этого связанные антитела выявляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL) (Pierce). Денситометрический анализ иммуноблоттов проводили при помощи программы ImageJ Национального института здоровья.

Y-лабиринт с двумя испытаниями.

Мышей исследовали в отношении кратковременной пространственной памяти при помощи задачи с прохождением Y-лабиринта с двумя испытаниями. Длина рукавов лабиринта составляла 35 см, ширина -

5 см и глубина - 10 см. На шторке, окружающей лабиринт, были размещены абстрактные метки. Эксперименты проводили при уровне освещенности, составлявшем 6 лк. Во время экспозиционной фазы мышей направляли в два рукава (стартовый рукав и один из оставшихся рукавов), которые можно было свободно исследовать на протяжении 4 мин, при этом доступ в третий рукав (новый рукав) блокировался дверцей, сделанной из того же материала, что и лабиринт. Затем мышей забирали из лабиринта и держали в клетке на протяжении 2 мин, пока лабиринт очищали 50% этанолом. Во время фазы испытаний мышей помещали в конец стартового рукава и позволяли им свободно исследовать все три рукава на протяжении 4 мин. Фазу испытаний записывали при помощи программного обеспечения TSE videoMot2 для того, чтобы визуальнo отследить и провести анализ поведения животных (TSE Systems, Bad Homburg, Germany). Записывали количество захождений в рукава и время, проведенное в новом рукаве. Подсчитывали среднее количество захождений в рукава и время, проведенное в двух других рукавах, которые были открыты во время сеанса обучения. Рассчитывали соотношение между количеством захождений в новый рукав (или временем, проведенным в нем) и средним значением по двум другим рукавам.

Контрольные животные дикого типа, у которых нет дефицита пространственной кратковременной памяти, как правило, характеризуются в этом исследовании соотношением между 1,5 и 2; Pennanen et al., *Genes Brain Behav* 5(5):369-79 (2006).

Анализ данных.

Данные ELISA переводили в логарифмическую шкалу для соответствия предположению о нормальном распределении для двухфакторного дисперсионного анализа. Разницу считали существенной при $p < 0,05$.

ch4E4(N30Q) существенно снижает количество растворимого человеческого тау у TauP301L мышей.

Уровни человеческого тау в ДЭА-растворимой, саркозил-растворимой и нерастворимой фракциях экстрактов белков головного мозга количественно оценивали методом ELISA. Большая часть человеческого тау была обнаружена в ДЭА-растворимой фракции (данные не показаны). Количество общего человеческого тау (hTau) было снижено в ДЭА-растворимой фракции от обработанных ch17C1(N31Q) и ch4E4(N30Q) мышей по сравнению с обработанными ФСБ мышами (в среднем 29% снижения для ch17C1(N31Q) и 37% для ch4E4(N30Q), фиг. 12А). Снижение также наблюдали для фосфорилированного тау (pT231, pS199 и pT181) в ДЭА-растворимой фракции (фиг. 12В, С и D соответственно). До этого мы наблюдали более низкую экспрессию человеческого тау у самок TauP301L мышей по сравнению с самцами. Следовательно, чтобы точно проанализировать данные, мы использовали двухфакторный дисперсионный анализ, в котором пол и тип обработки представляли собой две переменные. Влияние пола было подтверждено значением $p < 0,01$ для всех измерений растворимого человеческого тау (общий человеческий тау, pS199, pT181 и pT231 человеческого тау). Между полом и типом обработки связи не было ($0,49 < p < 0,91$ для всех измерений растворимого человеческого тау). Важно отметить наличие существенного влияния типа обработки в случае ДЭА-растворимого человеческого тау ($p < 0,05$ для hTau, pS199 и pT231 и $p = 0,06$ для pT181). Влияние типа обработки наблюдали преимущественно для ch4E4(N30Q). По сравнению с контрольным ФСБ ch4E4(N30Q) существенно снижал hTau ($p < 0,05$), pS199 ($p < 0,01$), pT231 ($p < 0,01$) и pT181 ($p < 0,05$). Измерения методом ELISA с применением саркозил-нерастворимой фракции показали наличие высокой вариабельности среди животных, но при этом не наблюдали какого-либо существенного влияния пола. В случае саркозил-нерастворимой фракции не наблюдали какого-либо существенного влияния типа обработки. Аналогично, в случае саркозил-растворимой фракции не наблюдали какого-либо существенного влияния типа обработки методом ELISA.

Вестерн-блоттинг с применением человеческого тау-специфического моноклонального антитела Tau12 выявил полноразмерный человеческий тау в виде одной полосы в 62 кДа как основной иммунореактивный компонент тау в ДЭА-растворимой фракции. Очевидное снижение количества полноразмерного человеческого тау наблюдали для большинства мышей, обработанных ch4E4(N30Q) и ch17C1(N31Q). Для саркозил-нерастворимой фракции наблюдали 64 кДа полосу и несколько других более высокомолекулярных полос, а также более низкомолекулярные полосы, предположительно соответствующие фрагментам человеческого тау. Денситометрический анализ показал высокую степень вариабельности среди отдельных животных, что препятствует проведению какого-либо количественного сравнения. При этом для всех человеческих белков тау наблюдали общее качественное снижение в случае саркозил-нерастворимой фракции, выявляемой при помощи Tau12, у обработанных ch17C1(N31Q) и ch4E4(N30Q) мышей (репрезентативный вестерн-блоттинг проиллюстрирован на фиг. 13).

Уровни лекарственного препарата в плазме крови.

Мышей еженедельно обрабатывали ch17C1(N31Q) и ch4E4(N30Q) в дозировке 10 мг/кг путем в.б. инъекции. Для оценки экспозиции препарата через 24 ч после последней обработки собирали образцы плазмы крови. Уровни лекарственного препарата в плазме крови измеряли методом ELISA с применением в качестве захватывающего агента гTau. Средние уровни ch17C1(N31Q) и ch4E4(N30Q) в плазме крови составили 200 и 145 мкг/мл соответственно, что позволяет предположить, что оба антитела имеют хорошую экспозицию в крови (фиг. 14).

Обработка антителами и пространственная память.

Более ранние исследования предположили наличие дефицита долговременной пространственной памяти, которая является гиппокамп-зависимой, у TauP301L мышей (Pennanen et al., *Genes Brain Behav* 5(5):369-79 (2006)). Сообщалось, что Y-лабиринт с двумя испытаниями представляет собой чувствительный тест для выявления дефицита кратковременной пространственной памяти у тау-трансгенных мышей (Troquier et al., *Curr Alzheimer Res.* 9(4):397-405 (2012)). Во время экспозиционной фазы все группы исследовали лабиринт одинаково, проводя одинаковое количество времени в каждом доступном рукаве (данные не показаны). Не было обнаружено различий при сравнении пройденной дистанции. Во время фазы испытаний обработанные ФСБ TauP301L мыши совершали приблизительно такое же количество захождений в новый рукав, как и в среднем в два других рукава, исследованные во время экспозиционной фазы (соотношение = 1,18), что позволяет сделать предположение о плохой кратковременной пространственной памяти у обработанных ФСБ TauP301L мышей. Мыши, обработанные ch17C1(N31Q) и ch4E4(N30Q), продемонстрировали предпочтение новому рукаву по сравнению с двумя другими рукавами, и они чаще заходили в новый рукав, чем в среднем в два другие рукава (соотношение=1,50 для ch17C1(N31Q) и 1,30 для ch4E4(N30Q)). Соотношение захождений в новый рукав для обработанных ch17C1(N31Q) и ch4E4(N30Q) TauP301L мышей по сравнению с обработанной ФСБ группой проиллюстрировано на фиг. 15.

Объем настоящего изобретения не ограничивается описанными отдельными вариантами реализации, которые приведены в качестве единичных иллюстраций отдельных аспектов изобретения, а также любыми композициями или способами, которые являются функционально эквивалентными и входят в объем этого изобретения. В действительности на основании вышеприведенного описания и прилагаемых графических материалов специалистам в данной области техники будет очевидно существование различных модификаций данного изобретения помимо тех, которые приведены и описаны в данном документе. Такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которое связывается с тау человека и содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую участки, определяющие комплементарность, тяжелой цепи (CDR VH) 1, 2 и 3 и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую участки, определяющие комплементарность, легкой цепи (CDR VL) 1, 2 и 3, причем участки CDR VH 1, 2 и 3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, соответственно, и участки CDR VL 1, 2 и 3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90, соответственно.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором участки CDR VH 1, 2 и 3 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, соответственно, и участки CDR VL 1, 2 и 3 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90, соответственно.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором VH состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48 и VL состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47 и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором VH состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47 и VL состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, причем указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечного Fv (scFv), одноцепочечного антитела и дисульфид-связанного Fv (sdFv).

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, причем указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи IgG1 человека и константную область легкой лямбда-цепи человека.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, причем указанное антитело или его фрагмент связано с полиэтиленгликолем.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент снабжено выявляемой меткой, выбранной из группы, состоящей из фермента, радиоизотопа, флуоресцентного соединения, хемилюминесцентного соединения, биолюминесцентного соединения и тяжелого металла.

11. Способ лечения нейродегенеративной таупатии или аномального накопления или отложения тау в центральной нервной системе у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8.

12. Способ по п.11, причем нейродегенеративная таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, комплекса амиотрофический боковой склероз/паркинсонизм-деменция, аргирофильной гранулярной деменции, амилоидной ангиопатии британского типа, церебральной амилоидной ангиопатии, кортикобазальной дегенерации, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, лобно-височной деменции, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, сцепленной с хромосомой 17, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, миозита с включенными тельцами, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, болезни Пика, связанной с прионными белками церебральной амилоидной ангиопатии, прогрессирующего надъядерного паралича, деменции с клубками, мультиинфарктной деменции.

13. Способ по п.11, причем нейродегенеративная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

14. Способ *in vivo* выявления накопления тау в головном мозге человека, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.10, при этом выявление накопления тау осуществляют по обнаружению выявляемой метки в головном мозге человека.

15. Фармацевтическая композиция для лечения нейродегенеративной таупатии или аномального накопления или отложения тау в центральной нервной системе у субъекта-человека, нуждающегося в этом, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Способ лечения нейродегенеративной таупатии или аномального накопления или отложения тау в центральной нервной системе у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение человеку терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.15.

17. Способ по п.16, причем нейродегенеративная таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, комплекса амиотрофический боковой склероз/паркинсонизм-деменция, аргирофильной гранулярной деменции, амилоидной ангиопатии британского типа, церебральной амилоидной ангиопатии, кортикобазальной дегенерации, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, лобно-височной деменции, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, сцепленной с хромосомой 17, лобно-височной лобарной дегенерации, миозита с включенными тельцами, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, болезни Пика, связанной с прионными белками церебральной амилоидной ангиопатии, прогрессирующего надъядерного паралича, деменции с клубками.

18. Способ по п.17, причем нейродегенеративная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

19. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8.

20. Полинуклеотид по п.19, содержащий:

(a) последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 173, кодирующую V_H -область, и SEQ ID NO: 174, кодирующую V_L -область, или

(b) последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 172, кодирующую V_H -область, и SEQ ID NO: 174, кодирующую V_L -область.

21. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.19 или 20.

22. Выделенная клетка-хозяин для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8, содержащая полинуклеотид по п.19 или 20.

23. Выделенная клетка-хозяин для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8, содержащая вектор экспрессии по п.21.

24. Способ получения антитела к тау человека или его фрагмента, связывающего тау человека по пп.1-8, включающий

культивирование клетки-хозяина по п.22 или 23 в клеточной культуре и

выделение антитела к тау человека или его тау-связывающего фрагмента из клеточной культуры.

25. Способ диагностирования нейродегенеративной таупатии, включающий:

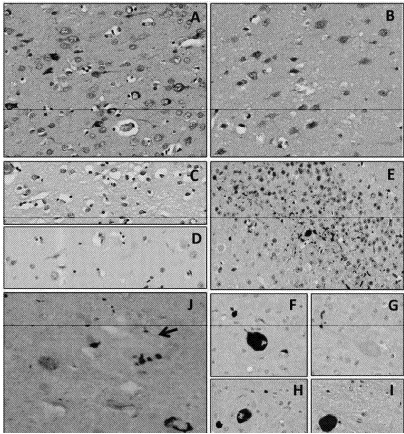
(a) измерение уровня патологически модифицированного или агрегированного тау в образце, полученном от субъекта, путем приведения в контакт антитела или его тау-связывающего фрагмента по любому из пп.1-8 или пп.9, 10 и

(b) сравнение уровня модифицированного или агрегированного тау со стандартом, который соответствует уровню патологически модифицированного или агрегированного тау у одного или более контрольных субъектов,

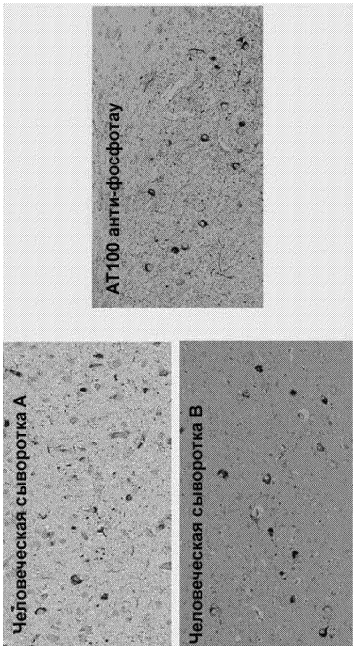
при этом разница или сходство между уровнем патологически модифицированного или агрегированного тау и стандартом свидетельствует о том, что субъект имеет нейродегенеративную таупатию.

A) NI-105 4E4-VH (последовательность вариабельной тяжелой цепи VH, SEQ ID NO:9)
--FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFNISAIHWVRQASGKLEWVGRIRKSHNYATLY
-----FR3-----CDR3-----JH-----
AASLKGRFTLSRDDSRNTAYLQMSSLQTEDMAVYYCTVLSANYDTFDYWGQGLTVTVSS
NI-105 4E4-VL (последовательность вариабельной легкой цепи VL, SEQ ID NO:11)
--FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
SYELTQPPSVSVSPGQTARISCFGDTLPKQYTYWYQQKPGQAFVLVIYKDTERPSSGIPERFS LPV
-----FR3-----CDR3-----JK-----
GSSSGTTVLTISGVQAEDEADYYCLSDNSATWVFGGGTKVTVL
B) NI-105 24B2-VH(последовательность вариабельной тяжелой цепи VH, SEQ ID NO:13)
FR1-----CDR1- FR2-----CDR2-----
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFVNYLIHWVRQAPGGGLEWMGLINPNGGNTSYAE
-----FR3-----CDR3---JH-----
KFGARVTLTSDTSTVYMDLSSLTSEDVAVYCAVLSPSNPWGQGTTVTVSS
NI-105 4E4-VL (последовательность вариабельной легкой цепи VL, SEQ ID NO:15)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
SYELTQPPSVSVSPGQTAGITCSGDALPKQFYWYQKPGQAFVLLIYKDTERPSPRIPERFS
V
-----CDR3-----JK-----
GSTSGTTVALTINGVQAEDEADYYCQSDRSGALNVFGGGTKLTVL
C) NI-105 4A3-VH (последовательность вариабельной тяжелой цепи VH, SEQ ID NO:17)
FR1-----CDR1- FR2-----CDR2-----
QVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMHWVRQAPGKGLQWVAVLSYEGTYKYYAL
-----FR3-----CDR3-----JH-----
SVKGRFTISRDNKNTLNQMSSLRVEDTAVYFCVKARAFASGQRSTSTVPDYWGQGLTVTV
SS
NI-105 4A3-VL (последовательность вариабельной легкой цепи VL, SEQ ID NO:19)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYATWYQQKSGQAFVLVIYEDNKRFSGIPERFS
-----CDR3-----JK-----
GSSSGTVATLTISGAQVDDEADYYCYSTDISGDLRVFGGGTKLTVL

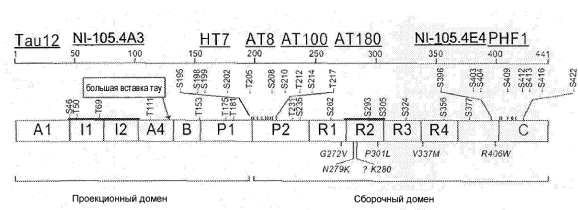
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

NI-105.17C1 VH (SEQ ID NO:44)
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISKAFGYSTNFWIGWVRQVPGKGLEWVGIIYPGDSIDTRYSPS
FQQQVTISADKSIDTAYLQWGHKLKASDSAMYFCARRGFWTGSQIEYWGQGTQVTVSS

NI-105.17C1 VL (SEQ ID NO:46)
QSALTQPPSASGSPGHSVTISC TGTSSDVGNYSEFVS WYQQYP GKAPKVIIMDVSKRSSGVPDR
FFGSKSANTASLTIVSGVQEEDEADYFCSSYGGGSKYPWFVGGGTLK TVL

Фиг. 7A

NI-105.6C5 VH (SEQ ID NO:48)
QVQLVESGGGVQPGGSLRLVSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFEDGSNEFY
ADSVKGRFTISRDNKNTFLQMNSLRAEDTAVYYCARDLGASVTTSAENFHHWGQGLTVT
VSS

NI-105.6C5 VL (SEQ ID NO:49)
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKRYVY WYQQKSGQAPVLVIMEDSKRPSGIPETFSG
SSSGTMTATLTISGAQVEDEADYCYSTDSNGHHWVFGGGTKLTVL

Фиг. 7B

NI-105.29G10 VH (SEQ ID NO:50)
EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFDGSGYSMAWVRQAPGKGLEWWSYISGTYSGGGTG
TMYLDSVKGRFFISRDDATSSLYLQMDSLRDEDTAVYYCARVYDYGEDWGQGLTVTVSS

NI-105.29G10 VK (SEQ ID NO:51)
DVMITQSPDSLAVSLGERATINCKSSRSVLYSSNSKNYLAWYQQKPGQPPLLIIYWASTRESG
VPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYGTPRTFGGQTKVEIK

Фиг. 7C

NI-105.6L9 VH (SEQ ID NO:52)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGTRFTFSTYAMGWVRQAPGRGLEWWSAIGGSGDSTSYA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGVYDYLWGSYRLFEDYWGQGLTVTVS
S

NI-105.6L9 VL (SEQ ID NO:53)
SYVLTPPPSVSVAPGQTARFTCGGNNAISKSVHHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSRIPERFS
GSNSGNTATLTISRVEAGDEADYCYQVVDSTSDHVVFGGGTKLTVL

Фиг. 7D

NI-105.40E8 VH (SEQ ID NO:54)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPNYYMTWVRQAPGKGLEWWSGISGGSTDYA
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTALYYCAKGGGIRGQGTMTVTSS

NI-105.40E8 VL (SEQ ID NO:55)
 QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCIGTSSDVGGYNYVSWHQHPGKAPKLLIYDVTKRPSGVPD
 RFSGSKSGNTAALTISGLQAEDEADYYCHSYVGSYTLVFGGGTKLTVL

Фиг. 7Е

NI-105.48E5 VH (SEQ ID NO:56)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWWSGRIRSKANSYATA
YAASVKGRTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSPVTITEVWGQGTTLTVSS

NI-105.48E5 VK (SEQ ID NO:57)
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKDYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
 VSDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPIITFGQGTKEIK

Фиг. 7F

NI-105.6E3 VH (SEQ ID NO:58)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIGSGMTFSSYAFNWWRQTPGKGLEWWSISRFGSTVDYT
DSVRGRFTISRDDGQRSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRSIASGSRSPGIWGGQTTVTSS

NI-105.6E3 VK (SEQ ID NO:59)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGVNNLAWFQOKPGKAPKSLIYAASSLQGGVPSKFS
 GSASGTDFSLTISNLQPEDFATYFCQQYNSYPWTFGQGTKEIK

Фиг. 7G

NI-105.22E1 VH (SEQ ID NO:60)
 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISKKGSGYRFTTYWIGWVRQMPGKLEWMGIYPGDSIDTRYSP
 SYQGQVTISADKISITAYLQWSSLKASDTGMYYCARVAGDIGENYYYGMDVWGQGTITVTV
 SS

NI-105.22E1 VK (SEQ ID NO:61)
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYGSNNKNYLAWYQQKLGQSPKLLIYWASARESG
 VPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKEIK

Фиг. 7H

NI-105.26B12 VH (SEQ ID NO:62)
 QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFTRYGMHWVRQAPGKLEWVAWIYDGTNKYY
ADSLQGRFTISRDTSTNTLYLQMNGLRVEDRAVYYCAREGFQGAIDYWGQGTTLTVSS

NI-105.26B12 VK (SEQ ID NO:64)
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNLVYSSDNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
 VPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKEIK

Фиг. 7I

NI-105.12E12 VH (SEQ ID NO:65)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSDSAFHWAQASGKLEWWSGRIRSKGNYYATA
YAASVKGRTIVSRDDSKNTLYLQMNSLKTDDTAIYYCIRQGSPSYGGINWGLGTLTVSS

NI-105.12E12 VK (SEQ ID NO:66)
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLVYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV
 PDRFSGSGSGTDFLTISSLRAEDVAVYYCQQYYSSPQTFGQGTKEIK

Фиг. 7J

NI-105.60E7 VH (SEQ ID NO:67)
 EVQLVESGGGFVRPGGSLRLSCATSGFTFTKAWMTWVRQAPVKGLEWIGHIKTRIEGATTDYA
APVEGRFTISRDDSKNMVYLQMNSLKTEDSGIYYCSTDFDYWGQGTTLTVSS

NI-105.60E7 VK (SEQ ID NO:68)
 DIVMTQSPSLPVTLGQPASISCTSSQSLLYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLMYKVKSRDPG
 VPDRFSGSGSGTDFLTISRVEAEDVGYYCMQGSLLWPRTFGQGTKEIK

Фиг. 7K

NI-105.14E2 VH (SEQ ID NO:69)
 EVQLVQSGAEVKKPGDSRLRISCKASGYNFPNYYWIGWVRQMPGKLEWMGIYPGDSIDIRYSP
SFQGHVTISSDKSITTAAYLQWTSKVAADSAMYYCARVERPDKGGWFGPWGQGTTLTVSS

NI-105.14E2 VK (SEQ ID NO:70)
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLVYSSNNQNYLAWYQHPGQPPKVLVYWASTREY
 VPDRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDVAVYYCQQYYNSPYIFGQGTKEIK

Фиг. 7L

NI-105.39E2 VH (SEQ ID NO:71)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMNWWVRQAPGKLEWVAHITSGGTPIFYAD
SVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRNDTALYFCVRGBTDYWGQGTTLTVSS

NI-105.39E2 VL (SEQ ID NO:72)
 QAGLTQPPSVSKDLRQTATLTCSGNSNNVGNQGAAWLQQFPGHPPKLLFYENINRPSGISER
 FSASRSGNTASLTITGLQPEDEADYYCSAWDGHLNAWVFGGGTKLTVL

Фиг. 7M

NI-105.19C6 VH (SEQ ID NO:73)
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYFISYWWGWRQMPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSP
SFEGQVSIADKSI STAYLQWTSLKASDTAMYYCARHWGPAAVTDS PWFGPWGQGLTVTVSS

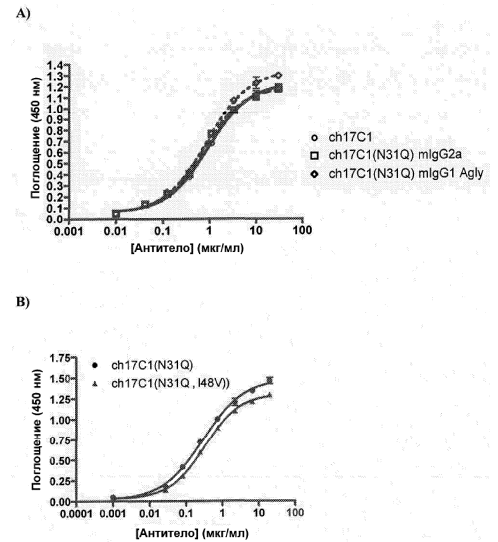
NI-105.19C6 VK (SEQ ID NO:74)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYTSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHYYSTPFTFGPGTKVDIK

Фиг. 7N

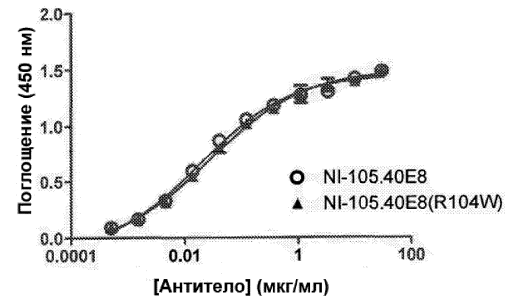
NI-105.9C4 VH (после праймер-индуцированных коррекций мутаций) (SEQ ID NO:76)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTAFFMHWWRQAPGQGLEWMGWINPD SGATKYA
HNFQGRVTMTTRDTSISTAFMELSGLKSDDTGVYYCATGMAVTGNFWGQGLTVTVSS

NI-105.9C4 VL (после праймер-индуцированных коррекций мутаций) (SEQ ID NO:78)
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDVLAETYARWFQQKPGQAPVLVMYRDRERPA GIPERFS
GSSSGNTVLTISGAQAEDEAVYHCHSVADNNLDWVFGGGTKLTVL

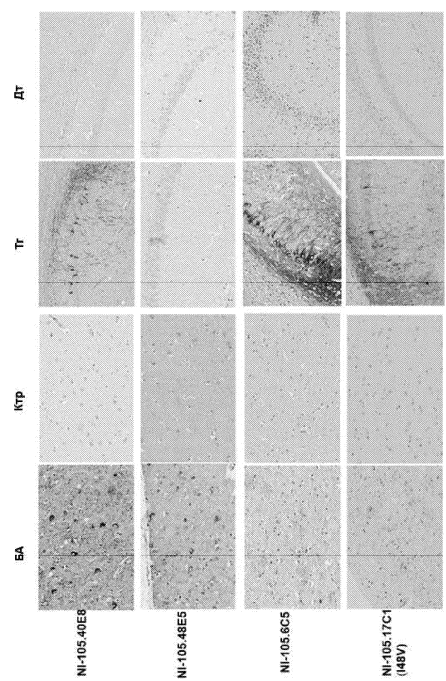
Фиг. 7O



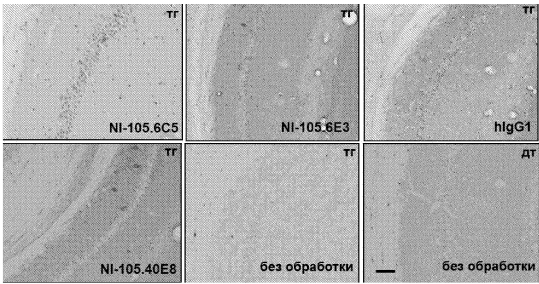
Фиг. 8A, B



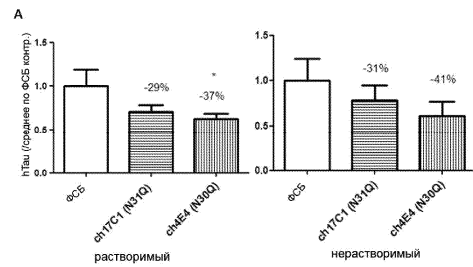
Фиг. 9



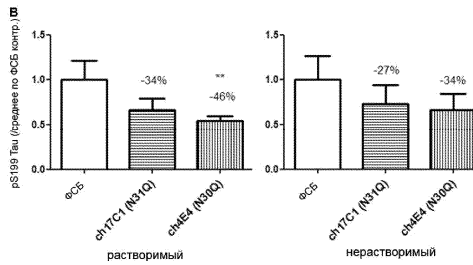
Фиг. 10



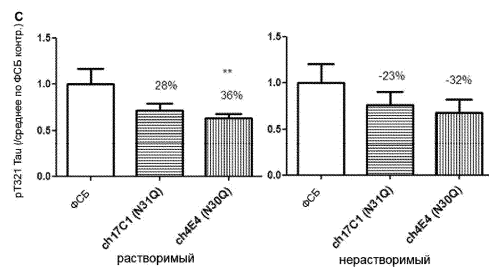
Фиг. 11



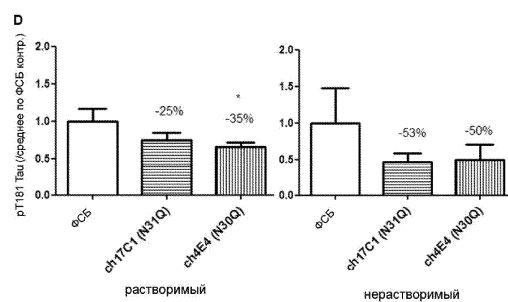
Фиг. 12А



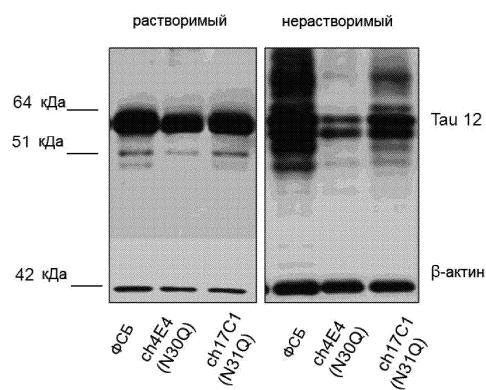
Фиг. 12В



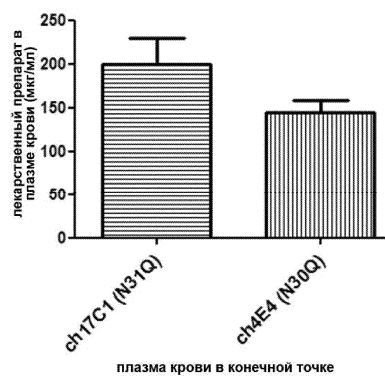
Фиг. 12С



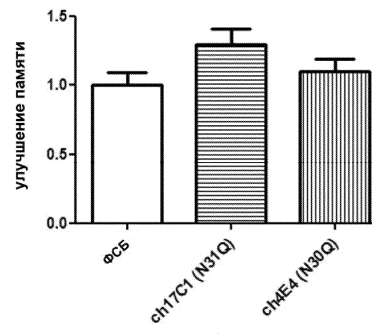
Фиг. 12D



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

