

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992598 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.10

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.05.02

(54) АНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ ТАУ

(31) 62/500,427; 62/580,408

(32) 2017.05.02; 2017.11.01

(33) US

(86) PCT/US2018/030739

(87) WO 2018/204546 2018.11.08

(88) 2018.12.13

(71) Заявитель:
ПРОТЕНА БИОСАЙЕНСИС
ЛИМИТЕД (IE)

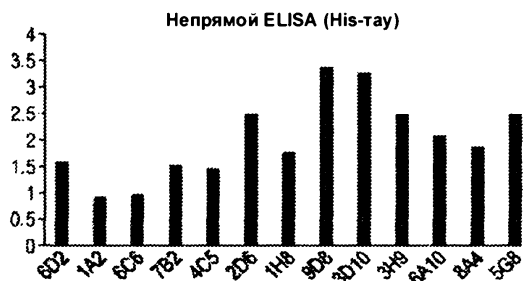
(72) Изобретатель:

Барбур Робин, Александер Светлана,
Ренц Марк Е., Гай Шанинг,
Долан Филип Джеймс, Ниджджар
Тарлохан С., Пэйн Филип (US)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)

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



A1

201992598

201992598

A1

АНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ ТАУ**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно разделу 35 § 119(e) Свода законов США на основании предварительной заявки США № 62/500,427, поданной 2 мая 2017 года, и предварительной заявки США № 62/580,408, поданной 1 ноября 2017 года, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Перечень последовательностей, записанный в файле 508111SEQLST.txt, составляет 107 килобайт, был создан 2 мая 2018 года и включен в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Тау представляет собой хорошо известный белок человека, который может существовать в фосфорилированных формах (см., например, публикации Goedert, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:4051-4055(1988); Goedert, EMBO J. 8:393-399(1989); Lee, Neuron 2:1615-1624(1989); Goedert, Neuron 3:519-526(1989); Andreadis, Biochemistry 31:10626-10633(1992). Сообщалось, что тау играет роль в стабилизации микротрубочек, в частности, в центральной нервной системе. Суммарный тау (с-тау, т.е., фосфорилированная и нефосфорилированная формы) и фосфо-тау (ф-тау, т.е. фосфорилированный тау) высвобождается головным мозгом в ответ на нейрональное повреждение и нейродегенерацию, и, как сообщалось, повышенные уровни тау наблюдаются в СМЖ (спинномозговой жидкости) пациентов, страдающих от болезни Альцгеймера, по сравнению с общей популяцией (Jack et al., Lancet Neurol 9: 119-28 (2010)).

[0004] Тау является важнейшим компонентом нейрофибриллярных клубков, которые наряду с бляшками являются характерным признаком болезни Альцгеймера. Клубки образуют аномальные фибриллы, которые составляют 10 нм в диаметре, встречающиеся в парах и перевивающиеся спиральным образом с регулярной периодичностью 80 нм. Тау в нейрофибриллярных клубках является аномально фосфорилированным (гиперфосфорилированным), причем фосфатные группы присоединены к специфичным сайтам на молекуле. При болезни Альцгеймера значительное присутствие нейрофибриллярных клубков наблюдается в слое II нейронов энторинальной области коры, в областях CA1 и областях опорной структуры гиппокампа, миндалевидного тела и

в более глубоких слоях (слои III, V и поверхностный VI) неокортекса. Также сообщалось, что гиперфосфорилированный тау препятствует сборке микротрубочек, что может вызвать разрушение нейронной сети.

[0005] Включения тау являются частью определения невропатологии нескольких нейродегенеративных болезней, включая болезнь Альцгеймера, лобно-височную лобарную дегенерацию, прогрессирующий надъядерный паралич и болезнь Пика.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЗАЯВЛЕННОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с тау. Некоторые такие антитела конкурируют за связывание с тау человека с антителом 5G8. Некоторые такие антитела связываются с тем же эпитопом на тау человека, что и 5G8.

[0007] Некоторые антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 5G8, причем 5G8 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 7, и вариабельной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 8. В некоторых антителах три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 11, 12 и 13), и три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 14, 15 и 16).

[0008] Например, антитело может представлять собой 5G8 или химерную, венированную или гуманизированную форму указанного антитела. В некоторых таких антителах вариабельная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых таких антителах вариабельная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых таких антителах каждая из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$.

[0009] Некоторые антитела представляют собой гуманизированные антитела. Некоторые антитела представляют собой гуманизированное или химерное антитело 5G8, которое специфично связывается с тау человека, причем 5G8 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 8. Некоторые антитела содержат гуманизированную зрелую вариабельную область тяжелой цепи,

которая содержит три CDR тяжелой цепи 5G8, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR легкой цепи 5G8.

[0010] В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения. В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 5G8 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 11-13), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 5G8 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 14-16). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 5G8 согласно Кэботу (SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:13), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 5G8 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 14-16). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 5G8 согласно Чотиа (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:13), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 5G8 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 14-16). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 5G8 согласно AbM (SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:13), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 5G8 согласно AbM (SEQ ID NO: 14-16). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 5G8 согласно контактному определению (SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO: 23), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 5G8 согласно контактному определению (SEQ ID NO:24-26).

[0011] Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO:33-40, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 41-46.

[0012] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H48 занимает I, H71 занимает S, H93 занимает S, и H94 занимает P. В некоторых антителах положения H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает I, S, S и P, соответственно. В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H48 занимает

I, H71 занимает S, H93 занимает S, и H94 занимает P. В некоторых антителах положения H1, H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает E, I, S, S и P, соответственно.

[0013] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H46 занимает D, H48 занимает I, H71 занимает

5 S, H93 занимает S, и H94 занимает P. В некоторых антителах положения H1, H46, H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает E, D, I, S, S и P, соответственно. В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H11 занимает L, H12 занимает V, H19 занимает R, H20 занимает L, H46 занимает D, H48 занимает I, H71 занимает S, H76 занимает N, H80 занимает L, H93
10 занимает S, и H94 занимает P. В некоторых антителах положения H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93 и H94 в области VH занимает E, L, V, R, L, D, I, S, N, L, S и P, соответственно.

[0014] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H66 занимает R, H67 занимает V, и H78 занимает V. В
15 некоторых антителах положения H66, H67 и H78 в области VH занимает R, V и V, соответственно.

[0015] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1 занимает Q или E, H11 занимает V или L, H12 занимает K или V, H19 занимает K или R, H20 занимает V или L, H23 занимает K или A, H46
20 занимает E или D, H48 занимает M или I, H66 занимает K или R, H67 занимает A или V, H71 занимает R или S, H76 занимает S или N, H78 занимает A или V, H80 занимает M или L, H93 занимает T, S или A, и H94 занимает I, P или R.

[0016] В некоторых антителах положения H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает I, S, S и P, соответственно. В некоторых антителах положения H1, H48, H71, H93 и H94 в
25 области VH занимает E, I, S, S и P, соответственно. В некоторых антителах положения H1, H46, H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает E, D, I, S, S и P, соответственно. В некоторых антителах положения H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93 и H94 в области VH занимает E, L, V, R, L, D, I, S, N, L, S и P, соответственно. В некоторых антителах положения H1, H11, H12, H19, H20, H23, H46, H48, H71, H76, H80, H93 и H94 в
30 области VH занимает E, L, V, R, L, A, D, I, S, N, L, S и P, соответственно. В некоторых антителах положения H66, H67, H78, H93 и H94 в области VH занимает R, V, V, A и R, соответственно. В некоторых антителах положения H1, H46, H48, H66, H67, H71, H78, H93 и H94 в области VH занимает E, D, I, R, V, S, V, S и P, соответственно.

[0017] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает V, L7 занимает S, L17 занимает E, L36 занимает L, L45 занимает Q, L46 занимает R, и L70 занимает D.

[0018] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает V, L36 занимает L, и L46 занимает R. В некоторых антителах положения L2, L36 и L46 в области VL занимает V, L и R, соответственно. В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает V, L36 занимает L, L46 занимает R, и L70 занимает D. В некоторых антителах положения L2, L36, L46 и L70 в области VL занимает V, L, R и D, соответственно. В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L45 занимает Q, и L70 занимает D. В некоторых антителах положения L45 и L70 в области VL занимает Q и D, соответственно.

[0019] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает I или V, L7 занимает T или S, L17 занимает Q или E, L36 занимает Y или L, L45 занимает K или Q, L46 занимает L или R, и L70 занимает G или D.

[0020] В некоторых антителах положения L2, L36 и L46 в области VL занимает V, L и R, соответственно. В некоторых антителах положения L2, L36, L46 и L70 в области VL занимает V, L, R и D, соответственно. В некоторых антителах положения L2, L7, L17, L36, L46 и L70 в области VL занимает V, S, E, L, R и D, соответственно. В некоторых антителах положения L45 и L70 в области VL занимает Q и D, соответственно. В некоторых антителах положения L2, L36, L45, L46 и L70 в области VL занимает V, L, Q, R и D, соответственно.

[0021] Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 33-40, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 41-46. Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 33-40, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 41-46.

[0022] В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 33-40, и зрелая переменная

последовательность SEQ ID NO:40, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46.

[0031] Некоторые антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 6A10, причем 6A10 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется переменной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 63, и переменной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO:64. В некоторых антителах три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 65, 66 и 67), и три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 68, 69 и 70).

[0032] Например, антитело может представлять собой 6A10 или химерную, венеризованную или гуманизированную форму указанного антитела. В некоторых таких антителах переменная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых таких антителах переменная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых таких антителах каждая из переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$.

[0033] Некоторые антитела представляют собой гуманизированные антитела. Некоторые антитела представляют собой гуманизированное или химерное антитело 6A10, которое специфично связывается с тау человека, причем 6A10 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:63 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:64. Некоторые антитела содержат гуманизированную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 6A10, и гуманизированную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 6A10.

[0034] В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения. В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 65-67), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 68-70). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой

цепи 6A10 согласно Кэботу (SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 68-70). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно Чотиа (SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74 и SEQ ID NO:67), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 68-70). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно AbM (SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:75 и SEQ ID NO:67), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно AbM (SEQ ID NO: 68-70). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно контактному определению (SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO: 77), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно контактному определению (SEQ ID NO:78-80).

[0035] Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO:85-87, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 88-90.

[0036] В некоторых антителах положение H48 в области VH занимает I.

[0037] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H16 занимает A или G, H48 занимает M или I, H69 занимает T или I, и H80 занимает M или L.

[0038] В некоторых антителах положение H48 в области VH занимает I. В некоторых антителах положения H16, H48, H69 и H80 в области VH занимает G, I, I и L, соответственно.

[0039] В некоторых антителах L46 в области VL занимает L.

[0040] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает P или S, L17 занимает Q или E, и L46 занимает R или L.

[0041] В некоторых антителах положение L46 в области VL занимает L. В некоторых антителах положения L12, L17 и L46 в области VL занимает S, E и L, соответственно.

[0042] Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и зрелая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90.

[0047] Некоторые антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 8A4, причем 8A4 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 91, и вариабельной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO:92. В некоторых антителах три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 93, 94 и 95), и три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 96, 97 и 98).

[0048] Например, антитело может представлять собой 8A4 или химерную, венированную или гуманизированную форму указанного антитела. В некоторых таких антителах вариабельная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых таких антителах вариабельная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых таких антителах каждая из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$.

[0049] Некоторые антитела представляют собой гуманизированные антитела. Некоторые антитела представляют собой гуманизированное или химерное антитело 8A4, которое специфично связывается с тау человека, причем 8A4 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:91 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:92. Некоторые антитела содержат гуманизированную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 8A4, и гуманизированную зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 8A4.

[0050] В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения. В некоторых антителах гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 8A4 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 93-95), и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 8A4 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 96-98). В некоторых антителах

гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 8A4 согласно Кэботу (SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 8A4 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 96-98). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 8A4 согласно Чотиа (SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102 и SEQ ID NO:95), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 8A4 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 96-98). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 8A4 согласно AbM (SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:103 и SEQ ID NO:95), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 8A4 согласно AbM (SEQ ID NO: 96-98). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 8A4 согласно контактному определению (SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:104 и SEQ ID NO: 105), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 8A4 согласно контактному определению (SEQ ID NO:106-108).

[0051] Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO:113-115, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 116-118.

[0052] В некоторых антителах положение H93 области VH занимает S.

[0053] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает V, H16 занимает G, H20 занимает L, и H68 занимает T. В некоторых антителах положения H12, H16, H20 и H68 в области VH занимает V, G, L и T, соответственно.

[0054] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает K или V, H16 занимает S или G, H20 занимает V или L, H48 занимает M или I, H67 занимает A или I, H68 занимает N или T, H85 занимает D или E, и H93 занимает S или A.

[0055] В некоторых антителах положение H93 в области VH занимает S. В некоторых антителах положения H12, H16, H20, H68 и H93 в области VH занимает V, G, L, T и S, соответственно. В некоторых антителах положения H12, H16, H20, H48, H67, H68 и H85 в области VH занимает V, G, L, I, A, T и E, соответственно.

[0056] В некоторых антителах положение L17 в области VL занимает E.

[0057] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L2 занимает I или V, L17 занимает Q или E, и L36 занимает F или L.

[0058] В некоторых антителах положение L17 в области VL занимает E. В некоторых антителах положения L2, L17 и L36 в области VL занимает V, E и L.

[0059] Некоторые антитела содержат зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 113-115, и зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 116-118.

[0060] Некоторые антитела содержат зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 113-115, и зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 116-118.

[0061] В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 113-115, и зрелая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 116-118.

[0062] В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113, и зрелая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113, и зрелая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113, и зрелая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118.

[0063] В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114, и зрелая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114, и зрелая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117. В некоторых антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ

ID NO:114, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118.

[0064] В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118.

[0065] Некоторые антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 7G6, причем 7G6 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется переменной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 119, и переменной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO:120. В некоторых антителах три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 121, 122 и 123), и три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 124, 125 и 126).

[0066] Например, антитело может представлять собой 7G6 или химерную, венированную или гуманизированную форму указанного антитела. В некоторых таких антителах переменная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых таких антителах переменная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых таких антителах каждая из переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$.

[0067] Некоторые антитела представляют собой гуманизированные антитела. Некоторые антитела представляют собой гуманизированное или химерное антитело 7G6, которое специфично связывается с тау человека, причем 7G6 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:119 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:120. Некоторые антитела содержат гуманизированную зрелую переменную область тяжелой

цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 7G6, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 7G6.

[0068] В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа,

5 AbM и контактного определения. В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 121-123), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 124-126). В некоторых антителах

10 гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно Кэботу (SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:122 и SEQ ID NO:123), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 124-126). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой

15 цепи 7G6 согласно Чотиа (SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130 и SEQ ID NO:123), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 124-126). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой

20 гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно AbM (SEQ ID NO: 124-126). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно контактному определению (SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:132 и SEQ ID NO: 133), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой

25 цепи 7G6 согласно контактному определению (SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:135 и SEQ ID NO:136).

[0069] Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO:139-140, и гуманизованную зрелую

30 переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 141-148.

[0070] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает V, H20 занимает L, H69 занимает I, H76 занимает N, H78 занимает A, H80 занимает L, H81 занимает Q, H92 занимает S, и H93

занимает Т. В некоторых антителах положения H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93, H101 в области VH занимает V, L, I, N, A, L, Q, S и T, соответственно.

[0071] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает K или V, H20 занимает V или L, H38 занимает R или K, H69 занимает M или I, H76 занимает S или N, H78 занимает V или A, H80 занимает M или L, H81 занимает E или Q, H92 занимает C или S, и H93 занимает A или T.

[0072] В некоторых антителах положения H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 в области VH занимает V, L, I, N, A, L, Q, S и T, соответственно. В некоторых антителах положения H12, H20, H38, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 в области VH занимает V, L, K, I, N, A, L, Q, S и T, соответственно.

[0073] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, и L103 занимает K. В некоторых антителах положения L12 и L103 в области VL занимает S и K, соответственно.

[0074] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L36 занимает L, и L103 занимает K. В некоторых антителах положения L12, L36 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно.

[0075] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L37 занимает L, и L103 занимает K. В некоторых антителах положения L12, L37 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно.

[0076] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L36 занимает L, L37 занимает L, и L103 занимает K. В некоторых антителах положения L12, L36, L37 и L103 в области VL занимает S, L, L и K, соответственно.

[0077] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L45 занимает K, и L103 занимает K. В некоторых антителах положения L12, L45 и L103 в области VL занимает S, K и K, соответственно.

[0078] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L100 занимает G, и L103 занимает K. В некоторых антителах положения L12, L100 и L103 в области VL занимает S, G и K, соответственно.

[0079] В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L36 занимает F или L, L37 занимает Q или L, L45 занимает R или K, L100 занимает Q или G.

[0080] В некоторых антителах положения L12 и L103 в области VL занимает S и K, соответственно. В некоторых антителах положения L12, L37 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно. В некоторых антителах положения L12, L36 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно. В некоторых антителах положения L12, L36, L37 и L103 в области VL занимает S, L, L и K, соответственно. В некоторых антителах положения L12, L45 и L103 в области VL занимает S, K и K, соответственно. В некоторых антителах положения L12, L36, L37, L45 и L103 в области VL занимает S, L, L, K и K, соответственно. В некоторых антителах положения L12, L100 и L103 в области VL занимает S, G и K, соответственно, как в hu7G6-VL_v7. В некоторых антителах положения L12, L36, L37, L100 и L103 в области VL занимает S, L, L, G и K, соответственно.

[0081] Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 139-140, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 141-148. Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 139-140, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 141-148.

[0082] В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 139-140, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 141-148.

[0083] В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:141. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:142. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:143. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:144. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:146. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:147. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:148.

[illegible]

тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:140, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:148.

5 [0085] Например, антитело может представлять собой химерное антитело. Например, антитело может представлять собой венированное антитело. Антитело может представлять собой интактное антитело. Антитело может представлять собой связывающий фрагмент. В варианте реализации связывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, Fab или Fab'2-фрагмент. Антитело может представлять собой Fab-фрагмент или одноцепочечный Fv. Некоторые из антител относятся к изотипу IgG1 человека, тогда как другие могут относиться к изотипу IgG2 или IgG4 человека.

10 [0086] Некоторые антитела содержат зрелую переменную область легкой цепи, слитую с константной областью легкой цепи, и зрелую переменную область тяжелой цепи, слитую с константной областью тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи некоторых антител представляет собой мутантную форму природной константной области тяжелой цепи человека, которая характеризуется пониженным связыванием с рецептором Fcγ по сравнению с природной константной областью тяжелой цепи человека. В некоторых антителах константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1.

15 [0087] Некоторые антитела могут содержать по меньшей мере одну мутацию в константной области, такую как мутация, которая снижает фиксацию или активацию комплемента константной областью, например, мутацию в одном или нескольких из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 и 331 согласно нумерации EU. Некоторые антитела содержат аланин в положениях 318, 320 и 322.

20 [0088] Некоторые антитела могут являться по меньшей мере на 95% масс./масс. чистыми. Антитело может быть конъюгировано с терапевтическим, цитотоксическим, цитостатическим, нейротрофическим или нейропротекторным средством.

25 [0089] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая любое из антител, раскрытых в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

30 [0090] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и/или легкую цепь любого из антител, раскрытых в настоящем документе, рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, и клетка-хозяин, трансформированная рекомбинантным вектором экспрессии.

35 [0091] Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы гуманизации любого антитела, отличного от антитела человека, описанного в настоящем документе, например, антитела 5G8 мыши, причем 5G8 характеризуется зрелой

вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:8. Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы гуманизации любого антитела, отличного от антитела человека, описанного в настоящем документе, например, антитела 6A10 мыши, причем 5 6A10 характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 63 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:64. Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы гуманизации любого антитела, отличного от антитела человека, описанного в настоящем документе, например, антитела 8A4 мыши, причем 8A4 характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой 10 цепи согласно SEQ ID NO: 91 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:92. Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы гуманизации любого антитела, отличного от антитела человека, описанного в настоящем документе, например, антитела 7G6 мыши, причем 7G6 характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 119 и зрелой вариабельной 15 областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:120. Такие способы могут включать в себя отбор одного или нескольких акцепторных антител, идентификацию аминокислотных остатков антитела мыши, которые необходимо сохранить, синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную легкую цепь, содержащую CDR 20 легкой цепи антитела мыши, и экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизованного антитела.

[0092] Также предложены способы получения антител, таких как гуманизованное, химерное или венированное антитело, например, гуманизованная, химерная или венированная формы 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6. В таких способах клетки, 25 трансформированные нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела, культивируют так, чтобы клетки секретировали антитело. Затем антитело можно очистить из среды для культуры клеток.

[0093] Линии клеток, продуцирующие любое из антител, раскрытых в настоящем документе, можно получить посредством введения в клетки вектора, кодирующего 30 тяжелую и легкую цепи антитела, и селективируемого маркера, размножения клеток в условиях для отбора клеток, содержащих увеличенное количество копий вектора, выделения единичных клеток из отобранных клеток; и создание банка клеток, клонированных из единичной клетки, отобранной на основании выхода антитела.

[0094] Некоторые клетки можно размножить в селективных условиях и провести 35 скрининг в отношении линий клеток, естественным образом экспрессирующих и

секретирующих по меньшей мере 100 мг/л/10⁶ клеток/24 часа. Из отобранных клеток можно выделить единичные клетки. Затем клетки, клонированные из единичной клетки, можно использовать для создания банка клеток. Единичные клетки можно отобрать в зависимости от желаемых свойств, таких как выход антитела. Иллюстративные линии

5 клеток представляют собой линии клеток, экспрессирующие 5G8.

[0095] В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования или снижения агрегации тау у субъекта, который страдает от опосредованного тау амилоидоза или подвержен риску развития опосредованного тау амилоидоза, причем указанные способы включают в себя введение субъекту эффективного режима антитела, раскрытого

10 в настоящем документе, и посредством этого ингибирование или снижение агрегации тау у субъекта. Иллюстративные антитела включают гуманизированные версии 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6.

[0096] Также предложены способы лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанные способы включают в себя введение

15 эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого лечение или осуществление профилактики заболевания. Примерами такого заболевания являются болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-

20 Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (Lewy body variant of Alzheimer disease, LBVAD) или прогрессирующий

25 надъядерный паралич (ПНП). В некоторых способах связанное с тау заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых способах пациент представляет собой носителя ApoE4.

[0097] Также предложены способы снижения нарушенной передачи тау, причем указанные способы включают в себя введение эффективного режима антитела,

30 раскрытого в настоящем документе, и посредством этого снижение передачи тау.

[0098] Также предложены способы индукции фагоцитоза тау, причем указанные способы включают в себя введение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого индукцию фагоцитоза тау.

[0099] Также предложены способы ингибирования агрегации или накопления тау, причем

35 указанные способы включают в себя введение эффективного режима антитела,

раскрытого в настоящем документе, и посредством этого ингибирование агрегации или накопления тау.

[0100] Также предложены способы ингибирования образования клубков тау, причем указанные способы включают в себя введение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе.

[0101] В настоящем изобретении также предложен способ обнаружения отложений тау-белка у субъекта, страдающего от или подверженного риску заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, причем указанные способы включают в себя введение субъекту антитела, раскрытого в настоящем документе, и обнаружение антитела, связавшегося с тау, у субъекта. Примерами такого заболевания являются болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

[0102] Согласно некоторым вариантам реализации антитело вводят в организм субъекта посредством внутривенной инъекции. Согласно некоторым вариантам реализации антитело вводят непосредственно в головной мозг субъекта посредством внутрочерепной инъекции или посредством сверления отверстия в черепе субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации антитело является меченым. Согласно некоторым вариантам реализации антитело является меченым флуоресцентной меткой, парамагнитной меткой или радиоактивной меткой. Согласно некоторым вариантам реализации радиоактивную метку обнаруживают с применением позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

[0103] В настоящем изобретении также предложен способ измерения эффективности лечения у субъекта, который получает лечение заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, причем указанный способ включает в себя измерение первого уровня отложений тау-белка у субъекта до лечения посредством введения субъекту антитела, раскрытого в настоящем документе, и обнаружение первого количества антитела, связавшегося с тау, у субъекта, введение субъекту лечения, измерение второго уровня отложений тау-белка у субъекта после лечения посредством введения субъекту антитела,

и обнаружение антитела, связавшегося с тау, у субъекта, причем снижение уровня отложенных тау-белка свидетельствует о положительном ответе на лечение.

[0104] В настоящем изобретении также предложен способ измерения эффективности лечения у субъекта, который получает лечение заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, причем указанный способ включает в себя измерение первого уровня отложенных тау-белка у субъекта до лечения посредством введения субъекту антитела, раскрытого в настоящем документе, и обнаружение первого количества антитела, связавшегося с тау, у субъекта, введение субъекту лечения, измерение второго уровня отложенных тау-белка у субъекта после лечения посредством введения субъекту антитела, и обнаружение второго количества антитела, связавшегося с тау, у субъекта, причем отсутствие изменения уровня отложенных тау-белка или незначительное увеличение отложенных тау-белка свидетельствует о положительном ответе на лечение.

[0105] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с пептидом, состоящим из остатков 199-213 SEQ ID NO:3.

[0106] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с пептидом, состоящим из остатков 262-276 SEQ ID NO:3.

[0107] Некоторые антитела специфично связываются как с пептидом, состоящим из остатков 199-213 SEQ ID NO:3, так и с пептидом, состоящим из остатков 262-276 SEQ ID NO:3.

[0108] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с полипептидом согласно SEQ ID NO:3 на эпитопе, содержащем по меньшей мере один остаток в пределах 199-213 SEQ ID NO:3.

[0109] Некоторые антитела связываются с эпитопом в пределах остатков 199-213 SEQ ID NO:3.

[0110] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с полипептидом согласно SEQ ID NO:3 на эпитопе, содержащем по меньшей мере один остаток в пределах 262-276 SEQ ID NO:3.

[0111] Некоторые антитела связываются с эпитопом в пределах остатков 262-276 SEQ ID NO:3.

[0112] Некоторые антитела специфично связываются с эпитопом, содержащим по меньшей мере один остаток как из 199-213, так и из 262-276 SEQ ID NO:3.

[0113] В настоящем изобретении также предложен способ лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение иммуногена, содержащего пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 5G8, причем пептид вызывает образование антител, которые специфично связываются с тау, у субъекта. В настоящем изобретении также предложен способ лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение иммуногена, содержащего пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 6A10, причем пептид вызывает образование антител, которые специфично связываются с тау, у субъекта. В настоящем изобретении также предложен способ лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение иммуногена, содержащего пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 8A4, причем пептид вызывает образование антител, которые специфично связываются с тау, у субъекта. В настоящем изобретении также предложен способ лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение иммуногена, содержащего пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 7G6, причем пептид вызывает образование антител, которые специфично связываются с тау, у субъекта. В настоящем изобретении также предложен способ лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение иммуногена, содержащего пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 3D6, причем пептид вызывает образование антител, которые специфично связываются с тау, у субъекта.

[0114] В некоторых таких способах по меньшей мере два из антител 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 и 3D6 специфично связываются с пептидом тау.

[0115] В некоторых таких способах эпитоп пептида тау состоит из 4-11 смежных аминокислот из остатков 199-213 SEQ ID NO:3 или из остатков 262-276 SEQ ID NO:3. В некоторых таких способах эпитоп пептида тау состоит из двух смежных сегментов аминокислот: одного сегмента из остатков 199-213 SEQ ID NO:3 и другого – из остатков 262-276 SEQ ID NO:3, причем два смежных сегмента в сумме состоят из 4-11 аминокислот.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0116] На фигурах 1A, 1B и 1C представлены результаты скрининговых анализов ELISA отобранных моноклональных антител мыши против тау.

[0117] На фигуре 2 представлена кинетика связывания отобранных моноклональных антител мыши против тау с рекомбинантным тау человека.

[0118] На фигуре 3 представлены результаты функциональных блокирующих анализов отобранных моноклональных антител мыши против тау.

[0119] На фигуре 4 представлены результаты экспериментов, демонстрирующие, что 5G8 иммунным способом захватывают тау из ткани, пораженной болезнью Альцгеймера человека.

[0120] На фигуре 5 представлено выравнивание переменных областей тяжелой цепи антитела 5G8 мыши, акцепторных aDabi-Fab2b-VH человека и гуманизированных версий антитела 5G8 (hu5G8_VH-v1, hu5G8_VH-v2, hu5G8_VH-v3, hu5G8_VH-v4, hu5G8_VH-v5, hu5G8_VH-v6, hu5G8_VH-v7, hu5G8_VH-v8).

[0121] На фигуре 6 представлено выравнивание переменных областей легкой цепи антитела 5G8 мыши, акцепторных aDabi-Fab2b-VL человека и гуманизированных версий антитела 5G8 (hu5G8-VL-v1, hu5G8-VL-v2, hu5G8-VL-v3, hu5G8-VL-v4, hu5G8-VL-v5 и hu5G8-VL-v6).

[0122] На фигуре 7 представлено выравнивание переменных областей тяжелой цепи антитела 6A10 мыши, акцепторных VH ACR16112 человека и гуманизированных версий антитела 6A10 (hu6A10_VH-v1, hu6A10_VH-v2 и hu6A10_VH-v3).

[0123] На фигуре 8 представлено выравнивание переменных областей легкой цепи антитела 6A10 мыши, акцепторных VL ABC66863 человека и гуманизированных версий антитела 6A10 (hu6A10VL-v1, hu6A10-VL-v2 и hu6A10-VL-v3).

[0124] На фигуре 9 представлено выравнивание переменных областей тяжелой цепи антитела 8A4 мыши, акцепторных VH ADU57742 человека и гуманизированных версий антитела 8A4 (hu8A4_VH-v1, hu8A4_VH-v2 и hu8A4_VH-v3).

[0125] На фигуре 10 представлено выравнивание переменных областей легкой цепи антитела 8A4 мыши, акцепторных VL ABA26100 человека и гуманизированных версий антитела 8A4 (hu8A4-VL-v1, hu8A4-VL-v2 и hu8A4-VL-v3).

[0126] На фигуре 11 представлено выравнивание переменных областей тяжелой цепи антитела 7G6 мыши, акцепторных 3U0T_VH человека и гуманизированных версий антитела 7G6 (hu7G6_VH-v1 и hu7G6_VH-v2).

[0127] На фигуре 12 представлено выравнивание переменных областей легкой цепи антитела 7G6 мыши, акцепторных 3U0T_VL человека и гуманизированных версий

антитела 7G6 (hu7G6-VL-v1, hu7G6-VL-v2, hu7G6-VL-v3, hu7G6-VL-v4, hu7G6-VL-v5, hu7G6-VL-v6, hu7G6-VL-7 и hu7G6-VL-8).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- 5 [0128] В SEQ ID NO:1 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау человека (Swiss-Prot P10636-8).
- [0129] В SEQ ID NO:2 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау человека (Swiss-Prot P10636-7).
- [0130] В SEQ ID NO:3 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау
- 10 человека (Swiss-Prot P10636-6) (тау человека 4R0N).
- [0131] В SEQ ID NO:4 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау человека (Swiss-Prot P10636-5)
- [0132] В SEQ ID NO:5 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау человека (Swiss-Prot P10636-4).
- 15 [0133] В SEQ ID NO:6 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау человека (Swiss-Prot P10636-2).
- [0134] В SEQ ID NO: 7 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 5G8 мыши.
- [0135] В SEQ ID NO: 8 представлена аминокислотная последовательность вариабельной
- 20 области легкой цепи антитела 5G8 мыши.
- [0136] В SEQ ID NO: 9 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи антитела 5G8 мыши, с сигнальным пептидом.
- [0137] В SEQ ID NO: 10 представлена последовательность нуклеиновой кислоты,
- 25 кодирующая вариабельную область легкой цепи антитела 5G8 мыши, с сигнальным пептидом.
- [0138] В SEQ ID NO: 11 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 5G8 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа.
- [0139] В SEQ ID NO:12 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2
- 30 антитела 5G8 мыши согласно Кэботу.
- [0140] В SEQ ID NO: 13 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 5G8 мыши согласно Кэботу.
- [0141] В SEQ ID NO: 14 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 5G8 мыши согласно Кэботу.

[0142] В SEQ ID NO: 15 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 антитела 5G8 мыши согласно Кэботу.

[0143] В SEQ ID NO: 16 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 5G8 мыши согласно Кэботу.

5 [0144] В SEQ ID NO: 17 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 5G8 мыши согласно Кэботу.

[0145] В SEQ ID NO: 18 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 5G8 мыши согласно Чотиа.

10 [0146] В SEQ ID NO: 19 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 5G8 мыши согласно контактному определению.

[0147] В SEQ ID NO:20 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 5G8 мыши согласно Чотиа.

[0148] В SEQ ID NO:21 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 5G8 мыши согласно AbM.

15 [0149] В SEQ ID NO:22 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 5G8 мыши согласно контактному определению.

[0150] В SEQ ID NO:23 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 5G8 мыши согласно контактному определению.

20 [0151] В SEQ ID NO: 24 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 5G8 мыши согласно контактному определению.

[0152] В SEQ ID NO: 25 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 антитела 5G8 мыши согласно контактному определению.

[0153] В SEQ ID NO: 26 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 5G8 мыши согласно контактному определению.

25 [0154] В SEQ ID NO:27 представлена аминокислотная последовательность модельной последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела 3F4 мыши против прионов, учетн. № 1CR9_H.

30 [0155] В SEQ ID NO:28 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательности гуманизированного Fab против дабигатрана aDabi-Fab2b-VH, учетн. № 4YHM_H.

[0156] В SEQ ID NO:29 представлена аминокислотная последовательность последовательности зародышевой линии человека IGHV1-46, учетн. № P01743.2.

35 [0157] В SEQ ID NO:30 представлена аминокислотная последовательность модельной последовательности варибельной области легкой цепи антитела мыши против прионов 3F4, учетн. № 1CR9_L.

[0158] В SEQ ID NO:31 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательности человека гуманизированного Fab против дабигатрана aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L.

[0159] В SEQ ID NO:32 представлена аминокислотная последовательность гена зародышевой линии человека IGKV2-29 учетн. №A2NJV5.2.

[0160] В SEQ ID NO:33 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH_1.

[0161] В SEQ ID NO:34 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH_2.

[0162] В SEQ ID NO:35 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH_3.

[0163] В SEQ ID NO:36 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH_4.

[0164] В SEQ ID NO:37 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH_5.

[0165] В SEQ ID NO:38 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH_6.

[0166] В SEQ ID NO:39 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH_7.

[0167] В SEQ ID NO:40 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH_8.

[0168] В SEQ ID NO:41 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VL_1.

[0169] В SEQ ID NO:42 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VL_2.

[0170] В SEQ ID NO:43 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VL_3.

[0171] В SEQ ID NO:44 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VL_4.

[0172] В SEQ ID NO:45 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VL_5.

[0173] В SEQ ID NO:46 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VL_6.

[0174] В SEQ ID NO: 47 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 5G8 мыши с сигнальным пептидом.

- [0175] В SEQ ID NO: 48 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела 5G8 мыши с сигнальным пептидом.
- [0176] В SEQ ID NO 49 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 6A10 мыши с сигнальным пептидом.
- 5 [0177] В SEQ ID NO: 50 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела 6A10 мыши с сигнальным пептидом.
- [0178] В SEQ ID NO: 51 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 7G6 мыши с сигнальным пептидом.
- [0179] В SEQ ID NO:52 представлена аминокислотная последовательность вариабельной
- 10 области легкой цепи антитела 7G6 мыши с сигнальным пептидом.
- [0180] В SEQ ID NO: 53 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 8A4 мыши с сигнальным пептидом.
- [0181] В SEQ ID NO:54 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела 8A4 мыши с сигнальным пептидом.
- 15 [0182] В SEQ ID NO: 55 представлена аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи антитела 3D6 мыши.
- [0183] В SEQ ID NO:56 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 3D6 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа.
- [0184] В SEQ ID NO:57 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2
- 20 антитела 3D6 мыши согласно Кэботу.
- [0185] В SEQ ID NO: 58 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 3D6 мыши согласно Кэботу.
- [0186] В SEQ ID NO:59 представлена аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи антитела 3D6 мыши.
- 25 [0187] В SEQ ID NO: 60 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 3D6 мыши согласно Кэботу.
- [0188] В SEQ ID NO: 61 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 антитела 3D6 мыши согласно Кэботу.
- [0189] В SEQ ID NO: 62 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3
- 30 антитела 3D6 мыши согласно Кэботу.
- [0190] В SEQ ID NO 63 представлена аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи антитела 6A10 мыши.
- [0191] В SEQ ID NO: 64 представлена аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи антитела 6A10 мыши.

- [0192] В SEQ ID NO: 65 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 6A10 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа.
- [0193] В SEQ ID NO:66 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 6A10 мыши согласно Кэботу.
- 5 [0194] В SEQ ID NO: 67 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 6A10 мыши согласно Кэботу.
- [0195] В SEQ ID NO: 68 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 6A10 мыши согласно Кэботу.
- [0196] В SEQ ID NO: 69 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2
- 10 антитела 6A10 мыши согласно Кэботу.
- [0197] В SEQ ID NO: 70 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 6A10 мыши согласно Кэботу.
- [0198] В SEQ ID NO: 71 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 6A10 мыши согласно Кэботу.
- 15 [0199] В SEQ ID NO: 72 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 6A10 мыши согласно Чотиа.
- [0200] В SEQ ID NO: 73 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 6A10 мыши согласно контактному определению.
- [0201] В SEQ ID NO:74 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2
- 20 антитела 6A10 мыши согласно Чотиа.
- [0202] В SEQ ID NO:75 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 6A10 мыши согласно AbM.
- [0203] В SEQ ID NO:76 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 6A10 мыши согласно контактному определению.
- 25 [0204] В SEQ ID NO:77 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 6A10 мыши согласно контактному определению.
- [0205] В SEQ ID NO: 78 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 6A10 мыши согласно контактному определению.
- [0206] В SEQ ID NO: 79 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2
- 30 антитела 6A10 мыши согласно контактному определению.
- [0207] В SEQ ID NO: 80 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 6A10 мыши согласно контактному определению.
- [0208] В SEQ ID NO:81 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательности вариабельной области тяжелой цепи человека, учетный № ACR16112.

[0209] В SEQ ID NO:82 представлена аминокислотная последовательность последовательности зародышевой линии человека IGHV1-2*02.

[0210] В SEQ ID NO:83 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательности человека варибельной области легкой цепи каппа человека, учетный № ABC66863.

[0211] В SEQ ID NO:84 представлена аминокислотная последовательность последовательности зародышевой линии человека IGKV2-30*02.

[0212] В SEQ ID NO:85 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 6A10 hu6A10-VH_1.

[0213] В SEQ ID NO:86 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 6A10 hu6A10-VH_2.

[0214] В SEQ ID NO:87 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 6A10 hu6A10-VH_3.

[0215] В SEQ ID NO:88 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 6A10 hu6A10-VL_1.

[0216] В SEQ ID NO:89 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 6A10 hu6A10-VL_2.

[0217] В SEQ ID NO:90 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 6A10 hu6A10-VL_3.

[0218] В SEQ ID NO: 91 представлена аминокислотная последовательность зрелой варибельной области тяжелой цепи антитела 8A4 мыши.

[0219] В SEQ ID NO: 92 представлена аминокислотная последовательность зрелой варибельной области легкой цепи антитела 8A4 мыши.

[0220] В SEQ ID NO: 93 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 8A4 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа.

[0221] В SEQ ID NO:94 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 8A4 мыши согласно Кэботу.

[0222] В SEQ ID NO: 95 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 8A4 мыши согласно Кэботу.

[0223] В SEQ ID NO: 96 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 8A4 мыши согласно Кэботу.

[0224] В SEQ ID NO: 97 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 антитела 8A4 мыши согласно Кэботу.

[0225] В SEQ ID NO: 98 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 8A4 мыши согласно Кэботу.

[0226] В SEQ ID NO: 99 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 8A4 мыши согласно Кэботу.

[0227] В SEQ ID NO: 100 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 8A4 мыши согласно Чотиа.

5 [0228] В SEQ ID NO: 101 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 8A4 мыши согласно контактному определению.

[0229] В SEQ ID NO:102 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 8A4 мыши согласно Чотиа.

10 [0230] В SEQ ID NO:103 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 8A4 мыши согласно AbM.

[0231] В SEQ ID NO:104 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 8A4 мыши согласно контактному определению.

[0232] В SEQ ID NO:105 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 8A4 мыши согласно контактному определению.

15 [0233] В SEQ ID NO: 106 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 8A4 мыши согласно контактному определению.

[0234] В SEQ ID NO: 107 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 антитела 8A4 мыши согласно контактному определению.

20 [0235] В SEQ ID NO: 108 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 8A4 мыши согласно контактному определению.

[0236] В SEQ ID NO:109 представлена аминокислотная последовательность модельной последовательности 3JAU VH.

25 [0237] В SEQ ID NO:110 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательности варибельной области тяжелой цепи человека, учетный № ADU57742:.

[0238] В SEQ ID NO:111 представлена аминокислотная последовательность модельной последовательности 3JAU VL.

30 [0239] В SEQ ID NO: 112 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательности человека варибельной области легкой цепи каппа человека, учетный № ABA26100.

[0240] В SEQ ID NO:113 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 8A4 hu8A4-VH_1.

[0241] В SEQ ID NO:114 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 8A4 hu8A4-VH_2.

[0242] В SEQ ID NO:115 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 8A4 hu8A4-VH_3.

[0243] В SEQ ID NO:116 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 8A4 hu8A4-VL_1.

5 **[0244]** В SEQ ID NO:117 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 8A4 hu8A4-VL_2.

[0245] В SEQ ID NO:118 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 8A4 hu8A4-VL_3.

10 **[0246]** В SEQ ID NO 119 представлена аминокислотная последовательность зрелой варибельной области тяжелой цепи антитела 7G6 мыши.

[0247] В SEQ ID NO: 120 представлена аминокислотная последовательность зрелой варибельной области легкой цепи антитела 7G6 мыши.

[0248] В SEQ ID NO: 121 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 7G6 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа.

15 **[0249]** В SEQ ID NO: 122 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 7G6 мыши согласно Кэботу.

[0250] В SEQ ID NO: 123 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 7G6 мыши согласно Кэботу.

20 **[0251]** В SEQ ID NO: 124 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 7G6 мыши согласно Кэботу.

[0252] В SEQ ID NO: 125 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 антитела 7G6 мыши согласно Кэботу.

[0253] В SEQ ID NO: 126 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 7G6 мыши согласно Кэботу.

25 **[0254]** В SEQ ID NO: 127 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 7G6 мыши согласно Кэботу.

[0255] В SEQ ID NO: 128 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 7G6 мыши согласно Чотиа.

30 **[0256]** В SEQ ID NO: 129 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 7G6 мыши согласно контактному определению.

[0257] В SEQ ID NO:130 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 7G6 мыши согласно Чотиа.

[0258] В SEQ ID NO:131 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 7G6 мыши согласно AbM.

[0259] В SEQ ID NO:132 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 7G6 мыши согласно контактному определению.

[0260] В SEQ ID NO:133 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 7G6 мыши согласно контактному определению.

5 [0261] В SEQ ID NO: 134 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 7G6 мыши согласно контактному определению.

[0262] В SEQ ID NO: 135 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 антитела 7G6 мыши согласно контактному определению.

10 [0263] В SEQ ID NO: 136 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 7G6 мыши согласно контактному определению.

[0264] В SEQ ID NO:137 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательности вариабельной области тяжелой цепи человека, учетный № PDB 3U0T_VH.

15 [0265] В SEQ ID NO: 138 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательности человека вариабельной области легкой цепи каппа человека, учетный № PDB 3U0T_VL.

[0266] В SEQ ID NO:139 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VH_1.

20 [0267] В SEQ ID NO:140 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VH_2.

[0268] В SEQ ID NO:141 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VL_1.

[0269] В SEQ ID NO:142 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VL_2.

25 [0270] В SEQ ID NO:143 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VL_3.

[0271] В SEQ ID NO:144 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VL_4.

30 [0272] В SEQ ID NO:145 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VL_5.

[0273] В SEQ ID NO:146 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VL_6

[0274] В SEQ ID NO:147 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VL_7.

[0275] В SEQ ID NO:148 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VL_8.

[0276] В SEQ ID NO: 149 представлена аминокислотная последовательность последовательности зародышевой линии человека IGHV1-69-2*01.

5

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0277] Моноклональные антитела или другие биологические молекулы, как правило, представлены в выделенной форме. Это означает, что антитело или другая биологическая молекула, как правило, являются по меньшей мере на 50% масс./масс. чистыми от
10 интерферирующих белков и других загрязняющих веществ, образующихся в процессе их получения или очистки, но не исключает возможности, что моноклональное антитело объединено с избытком фармацевтически приемлемого носителя или носителей либо другого наполнителя, предназначенного для облегчения применения антитела. Иногда моноклональные антитела являются по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или
15 99% масс./масс. чистыми от интерферирующих белков и загрязняющих веществ, образующихся в процессе получения или очистки. Часто выделенное моноклональное антитело или другая биологическая молекула является доминирующим макромолекулярным компонентом, остающимся после его очистки.

[0278] Специфичное связывание антитела с его антигеном-мишенью означает аффинность
20 и/или avidность, составляющую по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , или 10^{12} M^{-1} . Специфичное связывание является обнаруживаемо более высоким по величине и различным от неспецифичного связывания, возникающего с по меньшей мере одной неродственной мишенью. Специфичное связывание может являться следствием образования связей между конкретными функциональными группами или конкретной
25 пространственной укладкой (например, по типу замка и ключа), тогда как неспецифичное связывание обычно является следствием вандерваальсовых сил. Однако специфичное связывание не обязательно подразумевает, что антитело связывается с одной и только одной мишенью.

[0279] Основной структурной единицей антитела является тетрамер субъединиц. Каждый
30 тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара содержит одну «легкую» (приблизительно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (приблизительно 50 – 70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область из приблизительно 100 – 110 или более аминокислот, отвечающих, главным образом, за распознавание антигена. Данная вариабельная область изначально
35 экспрессируется связанной с отщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельную область

без сигнального пептида иногда называют зрелой вариабельной областью. Таким образом, например, зрелая вариабельная область легкой цепи означает вариабельную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, отвечающую, главным образом, за эффекторную функцию.

[0280] Легкие цепи классифицируют на каппа или лямбда. Тяжелые цепи, которые классифицируют на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. В пределах легких и тяжелых цепей вариабельные и константные области связаны «J»-областью, состоящей из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также содержит «D»-область, состоящую приблизительно из 10 или более аминокислот. (См., в общих чертах, руководство *Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 (полностью включено посредством ссылки для всех целей)).

[0281] Вариабельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (которую также называют в настоящем документе «вариабельный домен легкой цепи» («домен VL») или «вариабельный домен тяжелой цепи» («домен VH»), соответственно) состоит из «каркасного» участка (framework, FR), который перемежается тремя «участками, определяющими комплементарность» или «CDR» (complementarity determining regions). Каркасные участки служат для выравнивания CDR с целью специфического связывания с эпитопом антигена. CDR содержат остатки аминокислот антитела, отвечающие, главным образом, за связывание с антигеном. От аминоконца к карбоксиконцу как домены VL, так и домены VH содержат следующие каркасные (FR) участки и участки CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR 1, 2 и 3 домена VL также называют в настоящем документе, соответственно, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; CDR 1, 2 и 3 домена VH также называют в настоящем документе, соответственно, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. Когда в заявке раскрыта последовательность VL с R в качестве C-концевого остатка, R можно в качестве альтернативы считать N-концевым остатком константной области легкой цепи. Таким образом, настоящую заявку также следует понимать как раскрывающую последовательность VL без C-концевого R.

[0282] Распределение аминокислот к каждому из доменов VL и VH происходит в соответствии с любым общепринятым определением CDR. Общепринятые определения включают определение Кэбота (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), определение Чотиа (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883, 1989); сводное определение CDR Чотиа и Кэбота, в котором CDR-H1 представляет собой сводное

определение CDR Чотиа и Кэбота; определение AbM, используемое в программном обеспечении для молекулярного моделирования антител Оксфордского университета; и контактное определение согласно Martin et al (bioinfo.org.uk/abs) (см. таблицу 1). Определение согласно Кэботу обеспечивает широко используемую систему нумерации (нумерацию Кэбота), в которой соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями присваивают одинаковый номер. Когда говорят, что антитело содержит CDR согласно конкретному определению CDR (например, Кэботу), данное определение указывает на минимальное количество остатков CDR, присутствующих в антителе (т.е. CDR согласно Кэботу). Это не исключает того, что также присутствуют другие остатки, попадающие под другое общепринятое определение CDR, но за пределами указанного определения. Например, антитело, содержащее CDR, определенные согласно Кэботу, включает, среди других возможностей, антитело, в котором CDR содержат остатки CDR согласно Кэботу и не содержат другие остатки CDR, и антитело, в котором CDR H1 представляет собой CDR H1 согласно сводному определению Чотиа-Кэбота, а другие CDR содержат остатки CDR согласно Кэботу и не содержат дополнительные остатки CDR на основании других определений.

Таблица 1

Общепринятые определения CDR с применением нумерации Кэбота

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

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

- 5 [0283] Термин «антитело» включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены, за специфичное связывание с мишенью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₃, Dab, нанотела и Fv. Фрагменты можно получить посредством методик рекомбинантной ДНК или посредством ферментативного или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин «антитело» также
- 15 включает биспецифичное антитело и/или гуманизированное антитело. Биспецифичное или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, которое содержит две различные пары тяжелой/легкой цепей и два различных

связывающих сайта (см., например, публикации Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)). В некоторых биспецифичных антителах две различные пары тяжелой/легкой цепей содержат пару тяжелой цепи/легкой цепи гуманизированного 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6 и пару тяжелой цепи/легкой цепи, специфичную в отношении отличного эпитопа на тау, чем таковой, с которым связывается 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6.

[0284] В некоторых биспецифичных антителах одна пара тяжелой цепи/легкой цепи представляет собой гуманизированное антитело 5G8, гуманизированное антитело 6A10, гуманизированное антитело 8A4 или гуманизированное антитело 7G6, как более подробно раскрыто ниже, а другая пара тяжелой цепи/легкой цепи получена из антитела, которое связывается с рецептором, который экспрессирован на гематоэнцефалическом барьере, таким как инсулиновый рецептор, рецептор инсулиноподобного фактора роста (ИФР), лептиновый рецептор или липопротеиновый рецептор, или трансферриновый рецептор (Friden *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775, 1991; Friden *et al.*, *Science* 259:373-377, 1993). Такое биспецифичное антитело может переноситься через гематоэнцефалический барьер в результате рецептор-опосредованного трансцитоза. Поглощение биспецифичного антитела головным мозгом можно дополнительно усилить посредством конструирования биспецифичного антитела с целью снижения его аффинности к рецептору гематоэнцефалического барьера. Сниженная аффинность к рецептору приводила к более широкому распределению в головном мозге (см., например, публикации Atwal *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

[0285] Иллюстративные биспецифичные антитела могут также представлять собой: (1) антитело с двойным переменным доменом (dual-variable-domain antibody, DVD-Ig), в котором каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два переменных домена в tandem через короткую пептидную связь (Wu *et al.*, *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule*, In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab (тандемное антитело), которое представляет собой слияние двух одноцепочечных диател с получением тетравалентного биспецифичного антитела, содержащего два связывающих сайта для каждого из антигенов-мишеней; (3) антитело flexibody, которое представляет собой комбинацию scFv с диателом с получением мультивалентной молекулы; (4) так называемую молекулу, полученную методом «замка на причале» («dock and lock»), на основе «домена димеризации и докинга» в протеинкиназе A, которая при применении с Fab позволяет получить тривалентный биспецифичный связывающий белок, состоящий из двух идентичных Fab-

фрагментов, присоединенных к отличному Fab-фрагменту; или (5) так называемую молекулу Scorpion, содержащую, например, два scFv, слитых с обоими концами Fc-области человека. Примеры платформ, пригодных для получения биспецифичных антител, включают BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab и Mab2 (F-star), Fc-сконструированный IgG1 (Xencor) или DuoBody (на основе замены плеча Fab, Genmab).

[0286] Термин «эпитоп» означает сайт на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, которые сблизились в результате третичного фолдинга одного или нескольких белков. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами (также известны как линейные эпитопы), как правило, устойчивы к воздействию денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные в результате третичного фолдинга (также известны как конформационные эпитопы), обычно разрушаются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 3 или более, чаще не менее 5 или 8 – 10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, руководство Epitope Mapping Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

[0287] Антитела, которые распознают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы, можно идентифицировать с помощью обычного иммунного анализа, выявляющего способность одного антитела конкурировать со связыванием другого антитела с антигеном-мишенью. Эпитоп антитела может быть также определен с помощью рентгеновской кристаллографии антитела, связанного со своим антигеном, для идентификации контактных остатков. В качестве альтернативы, два антитела нацелены на один и тот же эпитоп, если все мутации аминокислот в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, также уменьшают или устраняют связывание другого антитела. Два антитела нацелены на перекрывающиеся эпитопы, если мутации некоторых аминокислот, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого антитела.

[0288] Конкуренцию между антителами определяют с помощью анализа, в котором исследуемое антитело ингибирует специфичное связывание эталонного антитела с известным антигеном (см., например, публикацию Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Исследуемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток исследуемого антитела (например, по меньшей мере 2-кратный, 5-кратный, 10-кратный, 20-кратный или 100-кратный) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей

мере на 50% по результатам измерения в анализе конкурентного связывания. Некоторые исследуемые антитела ингибируют связывание эталонных антител по меньшей мере на 75%, 90% или 99%. Антитела, идентифицированные с помощью конкурентного анализа (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным достаточно проксимально по отношению к эпитопу, с которым связывается эталонное антитело, для возникновения стерического барьера.

[0289] Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или вспомогательное средство является совместимым с другими компонентами состава и не является по существу вредным в отношении его реципиента.

[0290] Термин «пациент» включает человека или других субъектов-млекопитающих, получающих профилактическое или терапевтическое лечение.

[0291] Индивидуум подвержен увеличенному риску развития заболевания, если субъект характеризуется по меньшей мере одним известным фактором риска (например, генетический, биохимический, семейный анамнез и воздействие ситуационных факторов), который подвергает индивидуумов с данным фактором риска статистически значимому большему риску развития заболевания по сравнению с индивидуумами без фактора риска.

[0292] Термин «биологический образец» означает образец биологического материала в биологическом источнике или получаемого из биологического источника, например человека или субъекта-млекопитающего. Такие образцы могут представлять собой органы, органеллы, ткани, срезы тканей, жидкости организма, периферическую кровь, плазму крови, сыворотку крови, клетки, молекулы, такие как белки и пептиды, и любые части или комбинации, полученные из указанных образцов. Термин «биологический образец» может также охватывать любой материал, полученный в результате обработки образца. Полученный материал может включать клетки или их потомство. Обработка биологического образца может включать одну или несколько операций из фильтрации, дистилляции, экстракции, концентрирования, фиксации, инактивации интерферирующих веществ и т.п.

[0293] Термин «контрольный образец» означает биологический образец, который, как известно или как подозревают, не содержит области, пораженные связанным с тау заболеванием, или который по меньшей мере, как известно или как подозревают, не содержит пораженные заболеванием области данного типа. Контрольные образцы можно получить от индивидуумов, не страдающих от связанного с тау заболевания. В качестве альтернативы, контрольные образцы можно получить от пациентов, страдающих от

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

[0294] Термин «заболевание» означает любое аномальное состояние, которое нарушает физиологическую функцию. Термин используется в широком смысле, чтобы охватить любое нарушение, нездоровье, аномалию, патологию, болезнь, состояние или синдром,
15 при котором нарушена физиологическая функция, вне зависимости от природы этиологии.

[0295] Термин «симптом» относится к субъективному проявлению заболевания, такому как измененная походка, воспринимаемому субъектом. «Признак» относится к объективному проявлению заболевания, наблюдаемому врачом.

[0296] Термин «положительный ответ на лечение» означает более благоприятный ответ у
20 индивидуального пациента или средний ответ в популяции пациентов по сравнению со средним ответом в контрольной популяции, не получающей лечение.

[0297] С целью классификации аминокислотных замен на консервативные или неконсервативные аминокислоты сгруппированы следующим образом: Группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; Группа II (нейтральные гидрофильные
25 боковые цепи): cys, ser, thr; Группа III (кислые боковые цепи): asp, glu; Группа IV (основные боковые цепи): asn, gin, his, lys, arg; Группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): gly, pro; и Группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe. Консервативные замены включают замены между аминокислотами одного класса. Неконсервативные замены представляют собой замены аминокислот одного класса на
30 аминокислоты другого класса.

[0298] Процент идентичности последовательностей определяют с помощью последовательностей антител, максимально выровненных с использованием системы нумерации Кэбота. После выравнивания, если область представляющего интерес антитела (например, полную зрелую вариабельную область тяжелой или легкой цепи) сравнивают с
35 той же областью эталонного антитела, процент идентичности последовательностей между

областями представляющего интерес и эталонного антитела представляет собой количество положений, занятых одинаковыми аминокислотами, в областях как представляющего интерес, так и эталонного антитела, разделенное на общее количество выровненных положений двух областей, без подсчета разрывов, умноженное на 100 для преобразования в проценты.

[0299] Композиции или способы, «содержащие» или «включающие» один или несколько указанных элементов, могут содержать или включать другие элементы, конкретно не указанные. Например, композиция, которая «содержит» или «включает» антитело, может содержать антитело само по себе или в комбинации с другими компонентами.

[0300] Указание диапазона значений включает все целые значения внутри или в пределах указанного диапазона и все поддиапазоны, определенные целыми значениями внутри диапазона.

[0301] Если обратное не является очевидным из контекста, термин «приблизительно» охватывает несущественные вариации, такие как значения в пределах стандартной погрешности (например, СОС – стандартной ошибки среднего) от установленной величины

[0302] Статистическая значимость означает $p \leq 0,05$.

[0303] Формы единственного числа включают упоминания объектов во множественном числе, если контекст однозначно не диктует обратное. Например, термин «соединение» или «по меньшей мере одно соединение» может включать множество соединений, в том числе их смеси.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Общая часть

[0304] В настоящем изобретении предложены антитела, которые специфично связываются с тау. Некоторые иллюстративные специфичности связывания антител согласно настоящему изобретению характеризуются специфичным связыванием с пептидом, состоящим из остатков 199-213, или с пептидом, состоящим из остатков 262-276 SEQ ID NO:3 (которые соответствуют остаткам 257-271 или 320-334, соответственно, SEQ ID NO:1), или с обоими пептидами. Иллюстративные антитела согласно настоящему изобретению представляют собой 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6. Некоторые антитела связываются с эпитопом, содержащим по меньшей мере один остаток из остатков 199-213, или по меньшей мере один остаток из остатков 262-276 SEQ ID NO:3, или с обоими эпитопами. Некоторые антитела связываются с эпитопом, в котором все остатки эпитопа находятся в пределах остатков 119-213, или остатков 262-276 SEQ ID NO:3, или в

пределах обеих групп остатков. Некоторые антитела связываются с эпитопом, образованным из аминокислот в пределах как остатков 199-213, так и остатков 262-276 SEQ ID NO:3. Некоторые антитела связываются с эпитопом в пределах остатков 199-213 SEQ ID NO:3 или с остатками 262-276 SEQ ID NO:3. Некоторые антитела связываются с тау вне зависимости от статуса фосфорилирования. Некоторые антитела ингибируют или отсрочивают связанные с тау патологии и связанные ухудшения симптомов. Несмотря на то, что для реализации настоящего изобретения на практике понимание механизма не является необходимым, снижение токсичности может возникнуть в результате индуцированного антителом фагоцитоза тау, ингибирования меж- или внутримолекулярной агрегации тау или связывания с другими молекулами, посредством стабилизации нетоксичной конформации, посредством ингибирования межклеточной или внутриклеточной передачи патогенной формы тау, посредством блокады фосфорилирования тау, посредством предотвращения связывания тау с клетками или посредством индукции протеолитического расщепления тау, помимо других механизмов.

Антитела согласно настоящему изобретению или средства, которые индуцируют такие антитела, можно применять в способах лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера и других заболеваний, связанных с тау.

II. Молекулы-мишени

[0305] Если из контекста не очевидно обратное, указание на тау означает природную форму тау человека, включая все изоформы, вне зависимости от того, присутствует ли посттрансляционная модификация (например, фосфорилирование, гликирование или ацетилирование). Существует шесть основных изоформ (сплайс-вариантов) тау, образующихся в головном мозге человека. Самый длинный из данных вариантов содержит 441 аминокислоту, и в нем отщеплен начальный остаток met. Остатки нумеруют в соответствии с изоформой 441. Таким образом, например, упоминание фосфорилирования в положении 404 означает положение 404 изоформы 441 или соответствующее положение любой другой изоформы при максимальном выравнивании с изоформой 441. Аминокислотные последовательности изоформ и номера базы данных Swiss-Prot указаны ниже.

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG

70 80 90 100 110 120

SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD
TPSLEDEAAG

130 140 150 160 170 180

HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR

5 IPAKTPPAPK

190 200 210 220 230 240

TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK

250 260 270 280 290 300

SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK

10 CGSKDNIKHV

310 320 330 340 350 360

PGGGSVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV

QSKIGSLDNI

370 380 390 400 410 420

15 THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN

VSSTGSIDMV

430 440

DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

20 P10636-7 (SEQ ID NO:2)

10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT

PTEDGSEEPG

70 80 90 100 110 120

25 SETSDAKSTP TAEAEAGIG DTSPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD

KKAKGADGKT

130 140 150 160 170 180

KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPA KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS

PGSPGTPGSR

30 190 200 210 220 230 240

SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK

IGSTENLKHQ

250 260 270 280 290 300

PGGGKVQIIN KKLDLSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV YKPVDLSKVT
SKCGSLGNIH

310 320 330 340 350 360

HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR

5 ENAKAKTDHG

370 380 390 400 410

AEIVYKSPVV SGDTSPRHL NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

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

10 20 30 40 50 60

10 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEEAGI
GDTPSLEDEA

70 80 90 100 110 120

AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA
TRIPAKTPPA

15 130 140 150 160 170 180

PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS

190 200 210 220 230 240

AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ
SKCGSKDNIK

20 250 260 270 280 290 300

HVPGGGSVQI VYKPVDLSKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLDKFD
RVQSKIGSLD

310 320 330 340 350 360

NITHVPGGGN KKIETHKLTF RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSPRHL

25 SNVSSTGSID

370 380

MVDSPQLATL ADEVSASLAK QGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

10 20 30 40 50 60

30 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG

70 80 90 100 110 120

SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAEAGIGD
TPSLEDEAAG

130 140 150 160 170 180

HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR

5 IPAKTPPAPK

190 200 210 220 230 240

TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRs RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK

250 260 270 280 290 300

SRLQTAPVPM PDLKNVKSki GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK

10 CGSLGNIHHK

310 320 330 340 350 360

PGGGQVEVKS EKLDfKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFREN

AKAKTDHGAE

370 380 390 400 410

15 IVYKSPVVSG DTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT

PTEDGSEEPG

20 70 80 90 100 110 120

SETSDAKSTP TAEAEAEAGIG DTSPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD

KKAKGADGKT

130 140 150 160 170 180

KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPA KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS

25 PGSPGTPGSR

190 200 210 220 230 240

SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKS

IGSTENLKHQ

250 260 270 280 290 300

30 PGGGKVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV

QSKIGSLDNI

310 320 330 340 350 360

THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN

VSSTGSIDMV

370 380

DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

5 10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEEAGI
GDTPSLEDEA

70 80 90 100 110 120

10 AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA
TRIPAKTPPA

130 140 150 160 170 180

PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS
15

190 200 210 220 230 240

AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDLSKVT
SKCGSLGNIH

20 250 260 270 280 290 300

HKPGGGQVEV KSEKLDKFDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR
ENAKAKTDHG

310 320 330 340 350

25 AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

[0306] Указание на тау включает известные природные вариации, приблизительно 30 из которых перечислены в базе данных Swiss-Prot, и их пермутации, а также мутации, связанные с патологиями тау, такими как, среди прочих, деменция, болезнь Пика, надъядерный паралич (см., например, базу данных Swiss-Prot и публикацию Poorkaj, et al. Ann Neurol. 43:815-825 (1998)). Некоторые примеры мутаций тау, пронумерованных согласно изоформе 441, представляют собой мутацию лизина на треонин в остатке аминокислоты 257 (K257T), мутацию изолейцина на валин в положении аминокислоты 260 (I260V); мутацию глицина на валин в положении аминокислоты 272 (G272V);

мутацию аспарагина на лизин в положении аминокислоты 279 (N279K); мутацию аспарагина на гистидин в положении аминокислоты 296 (N296H); мутацию пролина на серин в положении аминокислоты 301 (P301S); мутацию пролина на лейцин в положении аминокислоты 301 (P301L); мутацию глицина на валин в положении аминокислоты 303 (G303V); мутацию серина на аспарагин в положении 305 (S305N); мутацию глицина на серин в положении аминокислоты 335 (G335S); мутацию валина на метионин в положении 337 (V337M); мутацию глутаминовой кислоты на валин в положении 342 (E342V); мутацию лизина на изолейцин в положении аминокислоты 369 (K369I); мутацию глицина на аргинин в положении аминокислоты 389 (G389R); и мутацию аргинина на триптофан в положении аминокислоты 406 (R406W).

[0307] Тау может являться фосфорилированным по одному или нескольким остаткам аминокислот, включая тирозин в положениях аминокислоты 18, 29, 97, 310 и 394, серин в положениях аминокислоты 184, 185, 198, 199, 202, 208, 214, 235, 237, 238, 262, 293, 324, 356, 396, 400, 404, 409, 412, 413 и 422; и треонин в положениях аминокислоты 175, 181, 205, 212, 217, 231 и 403.

Если из контекста не очевидно обратное, указание на тау или их фрагменты включает природные аминокислотные последовательности человека, включая их изоформы, мутанты и аллельные варианты.

III. Антитела

A. Специфичность связывания и функциональные свойства

[0308] В настоящем изобретении предложены антитела, которые связываются с тау. Некоторые антитела связываются с тау вне зависимости от статуса фосфорилирования.

- 5 Некоторые антитела связываются с эпитопом, не содержащим остаток, подлежащий фосфорилированию. Данные антитела можно получить посредством иммунизации полипептидом тау, очищенным из природного источника или экспрессированным рекомбинантным способом. Можно провести скрининг антител в отношении связывания с тау в нефосфорилированной форме, а также в форме, в которой один или несколько
- 10 остатков, поддающихся фосфорилированию, являются фосфорилированными. Такие антитела, предпочтительно, связываются с неотличимыми аффинностями или по меньшей мере в пределах 1,5-, 2- или 3-кратной величины аффинности с фосфорилированным тау по сравнению с нефосфорилированным тау (т.е. являются «панспецифичными»). 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 представляет собой примеры панспецифичных моноклональных антител.
- 15 В настоящем изобретении также предложены антитела, связывающиеся с тем же или с перекрывающимся эпитопом, что и эпитоп 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6. Также включены антитела, конкурирующие за связывание с тау с 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6.

- [0309] Вышеупомянутые антитела можно получить *de novo* посредством иммунизации полноразмерным полипептидом тау или его пептидным фрагментом. Такие пептиды,
- 20 предпочтительно, присоединены к гетерологичной конъюгированной молекуле, которая способствует вызову ответа в форме антител на пептид. Присоединение может являться прямым или опосредованным спейсерным пептидом или аминокислотами. Цистеин используют в качестве спейсерной аминокислоты, поскольку его свободная SH-группа облегчает присоединение молекулы-носителя. Также можно применять полиглициновый
- 25 линкер (например, 2 – 6 глицинов) с остатком цистеина между глицинами и пептидом или без такого остатка. Молекула-носитель выступает для обеспечения Т-клеточного эпитопа, который способствует вызову ответа в форме антител на пептид. Общепринято используют некоторые носители, в частности, гемоцианин фисуреллы (keyhole limpet hemocyanin, KLH), овальбумин и бычий сывороточный альбумин (БСА). К пептидному
- 30 иммуногену в процессе твердофазного пептидного синтеза можно добавить пептидные спейсеры. Носители, как правило, добавляют посредством химического перекрестного сшивания. Некоторые примеры химических перекрестно-сшивающих веществ, которые можно применять, включают сложный эфир кросс-N-малеимидо-6-аминокапроила или сложный эфир m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид (MBS) (см., например,
- 35 публикации Harlow, E. et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1988; Sinigaglia et al., Nature, 336:778-780 (1988); Chicz et al., J. Exp. Med., 178:27-47 (1993); Hammer et al., Cell 74:197-203 (1993); Falk K. et al., Immunogenetics, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; и Southwood et al. J. Immunology, 160:3363-3373 (1998)). Носитель и спейсер, в случае наличия, могут быть присоединены к
5 любому концу иммуногена.

[0310] Пептид с необязательным спейсером и носителем можно применять для иммунизации лабораторных животных или В-клеток, как описано более подробно ниже. Можно исследовать способность супернатантов гибридомы связываться с фосфорилированной и нефосфорилированной формами тау, такими как, например,
10 полноразмерная изоформа тау с положением 404 в фосфорилированной форме. Пептид может быть присоединен к носителю или другой метке для облегчения скринингового анализа. В данном случае носитель или метка, предпочтительно, отличны от комбинации молекулы спейсера и носителя, которые применяли для иммунизации, для устранения антител, специфичных в отношении спейсера или носителя вместо пептида тау. Можно
15 применять любую из изоформ тау.

[0311] В настоящем изобретении предложены моноклональные антитела, связывающиеся с эпитопами в пределах тау. Антитело, обозначенное 5G8, представляет собой одно такое иллюстративное антитело мыши. Если из контекста не очевидно обратное, упоминание о 5G8 следует понимать как упоминание о любой из формы мыши, химерной, венированной
20 и гуманизированной формы данного антитела. Антитело было депонировано как [НОМЕР ДЕПОНИРОВАНИЯ]. Данное антитело также характеризуется способностью связываться как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным тау, как с непатологической, так и с патологической формами и конформациями тау, и с неправильно свернутыми/агрегированными формами тау.

[0312] Были выделены дополнительные антитела, которые конкурируют с 5G8 за связывание с тау и/или связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и 5G8, обозначенные 6A10, 8A4, 7G6 и 3D6, которые продуцируются одноименными гибридомами. 6A10 содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, которые характеризуются SEQ ID NO:49 и SEQ ID NO:50, соответственно, и представляют собой
30 изотипы IgG1/каппа мыши. 6A10 содержит зрелые переменные области тяжелой и легкой цепей (после отщепления сигнального пептида), которые характеризуются SEQ ID NO:63 и SEQ ID NO:64, соответственно. Если из контекста не очевидно обратное, упоминание 6A10 следует понимать как упоминание о любой из формы мыши, химерной, венированной и гуманизированной формы данного антитела. 6A10 было депонировано
35 как [НОМЕР ДЕПОНИРОВАНИЯ]. 6A10 также характеризуется способностью

связываться как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным тау, как с непатологической, так и с патологической формами и конформациями тау, и с неправильно свернутыми/агрегированными формами тау.

5 **[0313]** 7G6 содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, которые характеризуются SEQ ID NO:51 и SEQ ID NO:52, соответственно, и представляют собой изотипы IgG2b/каппа мыши. 7G6 содержит зрелые переменные области тяжелой и легкой цепей (после отщепления сигнального пептида), которые характеризуются SEQ ID NO:119 и SEQ ID NO:120, соответственно. Если из контекста не очевидно обратное, упоминание 7G6 следует понимать как упоминание о любой из формы мыши, химерной, венированной и гуманизированной формы данного антитела. 7G6 было депонировано как 10 **[НОМЕР ДЕПОНИРОВАНИЯ]**. 7G6 также характеризуется способностью связываться как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным тау, как с непатологической, так и с патологической формами и конформациями тау, и с неправильно свернутыми/агрегированными формами тау.

15 **[0314]** 8A4 содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, которые характеризуются SEQ ID NO:53 и SEQ ID NO: 54, соответственно, и представляют собой изотипы IgG1/каппа мыши. 8A4 содержит зрелые переменные области тяжелой и легкой цепей (после отщепления сигнального пептида), которые характеризуются SEQ ID NO:91 и SEQ ID NO:92, соответственно. Если из контекста не очевидно обратное, упоминание 20 8A4 следует понимать как упоминание о любой из формы мыши, химерной, венированной и гуманизированной формы данного антитела. 8A4 было депонировано как **[НОМЕР ДЕПОНИРОВАНИЯ]**. 8A4 также характеризуется способностью связываться как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным тау, как с непатологической, так и с патологической формами и конформациями тау, и с неправильно 25 свернутыми/агрегированными формами тау.

[0315] 3D6 содержит зрелые переменные области тяжелой и легкой цепей, которые характеризуются SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO:59, соответственно, и представляют собой изотипы IgG1 каппа мыши. В случае 3D6 три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 56, 57 и 58), и три 30 CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно Кэботу (SEQ ID NO: 60, 61 и 62). Описание 3D6 и его гуманизированных вариантов см. в публикации PCT/IB2017/052544, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки для всех целей. Если из контекста не очевидно обратное, упоминание 3D6 следует понимать как упоминание о любой из формы мыши, химерной, венированной и 35 гуманизированной формы данного антитела. 3D6 было депонировано как **[НОМЕР**

ДЕПОНИРОВАНИЯ]. 3D6 также характеризуется способностью связываться как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным тау, как с непатологической, так и с патологической формами и конформациями тау, и с неправильно свернутыми/агрегированными формами тау.

5 [0316] Необязательно, антитела согласно настоящему изобретению не включают антитело 6A10, раскрытое в публикации PCT/IB2017/052544. Необязательно, антитела согласно настоящему изобретению не включают антитело 8A4. Необязательно, антитела согласно настоящему изобретению не включают антитело 7G6. Необязательно, антитела согласно настоящему изобретению не включают антитело 3D6, раскрытое в публикации
10 PCT/IB2017/052544.

[0317] Некоторые антитела согласно настоящему изобретению связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и антитело, обозначенное 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 или 3D6. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 5G8 обозначены SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 6A10 обозначены SEQ ID NO: 63 и 64, соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 8A4 обозначены SEQ ID NO: 91 и 92, соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 7G6 обозначены SEQ ID NO: 119 и 120, соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 3D6 обозначены SEQ ID NO: 55 и 59, соответственно. Другие антитела, характеризующиеся такой специфичностью связывания, можно получить посредством иммунизации мышей тау или его частью, содержащей желаемый эпитоп, и проведения скрининга полученных в результате антител в отношении связывания с тау, необязательно в конкуренции с антителом, содержащим переменные области 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 или
20 3D6 мыши (IgG1 каппа). Фрагменты тау, содержащие желаемый эпитоп, могут быть присоединены к носителю, который способствует вызову ответа в форме антител на фрагмент, и/или могут быть объединены с адъювантом, который способствует вызову такого ответа. Можно провести скрининг таких антител в отношении отличающегося связывания с тау или его фрагментом по сравнению с мутантами указанных остатков.
30 Скрининг по сравнению с такими мутантами более точно определяет специфичность связывания, чтобы обеспечить идентификацию антител, связывание которых ингибируется посредством мутагенеза конкретных остатков и которые, вероятно, характеризуются одинаковыми функциональными свойствами с другими иллюстративными антителами. Мутации могут представлять собой систематическую
35 замену замещением аланином (или серином, если аланин уже присутствует) одного

остатка за один раз или в течение более длительных интервалов времени, на всем протяжении мишени или на всем протяжении ее части, в которой, как известно, располагается эпитоп. Если один и тот же набор мутаций в значительной степени снижает связывание двух антител, два антитела связываются с одним эпитопом.

- 5 **[0318]** Антитела, которые характеризуются специфичностью связывания выбранного антитела мыши (например, 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 или 3D6), можно также получить с применением варианта способа фагового дисплея. См. публикацию Winter, WO 92/20791. Данный способ, в частности, подходит для получения антител человека. В данном способе
- 10 переменную область тяжелой или легкой цепи выбранного антитела мыши используют в качестве исходного материала. Если, например, в качестве исходного материала выбирают переменную область легкой цепи, конструируют фаговую библиотеку, в которой члены экспонируют одну и ту же переменную область легкой цепи (т.е. исходный материал мыши) и различные переменные области тяжелой цепи. Переменные области тяжелой цепи можно, например, получить из библиотеки реаранжированных переменных
- 15 областей тяжелых цепей человека. Выбирают фаг, демонстрирующий мощное специфичное связывание с тау или его фрагментом (например, по меньшей мере 10^8 и, предпочтительно, по меньшей мере $10^9 M^{-1}$). Затем переменные области тяжелой цепи из данного фага используют в качестве исходного материала для конструирования следующей фаговой библиотеки. В данной библиотеке каждый фаг экспонирует одну и ту же
- 20 переменную область тяжелой цепи (т.е. область, идентифицированную из первой библиотеки дисплея) и различные переменные области легкой цепи. Переменные области легкой цепи можно получить, например, из библиотеки реаранжированных переменных областей легкой цепи человека. Вновь выбирают фаг, демонстрирующий мощное специфичное связывание с тау или его фрагментом. Полученные в результате
- 25 антитела обычно характеризуются одинаковой или аналогичной эпитопной специфичностью, что и исходный материал мыши.

[0319] CDR тяжелой цепи 5G8 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа обозначены SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно, и CDR легкой цепи 5G8 согласно Кэботу обозначены SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно.

- 30 **[0320]** В таблице 2 представлены CDR 5G8 согласно определениям Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота (также называют в настоящем документе «сводное определение Кэбота/Чотиа»), AbM и контактному определению.

Таблица 2

CDR 5G8 согласно определению Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота, AbM и контактному определению

Петля	Кэбот	Чотиа	Сводное определение Чотиа и Кэбота	AbM	Контактное определение
L1	L24--L34 SEQ ID NO:14	L24--L34 SEQ ID NO:14	L24--L34 SEQ ID NO:14	L24--L34 SEQ ID NO:14	L30--L36 SEQ ID NO: 24
L2	L50--L56 SEQ ID NO:15	L50--L56 SEQ ID NO: 15	L50--L56 SEQ ID NO: 15	L50--L56 SEQ ID NO: 15	L46--L55 SEQ ID NO: 25
L3	L89--L97 SEQ ID NO: 16	L89--L97 SEQ ID NO:16	L89--L97 SEQ ID NO: 16	L89--L97 SEQ ID NO: 16	L89--L96 SEQ ID NO:26
H1	H31--H35B SEQ ID NO: 17	H26--H32 SEQ ID NO:18	H26--H35B SEQ ID NO:11	H26--H35B SEQ ID NO:11	H30--H35B SEQ ID NO:19
H2	H50--H65 SEQ ID NO: 12	H52--H56 SEQ ID NO:20	H50--H65 SEQ ID NO: 12	H50--H58 SEQ ID NO:21	H47--H58 SEQ ID NO:22
H3	H95--H102 SEQ ID NO: 13	H95--H102 SEQ ID NO:13	H95--H102 SEQ ID NO: 13	H95--H102 SEQ ID NO: 13	H93--H101 SEQ ID NO:23

[0321] CDR тяжелой цепи 6A10 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа обозначены SEQ ID NO: 65-67, соответственно, и CDR легкой цепи 6A10 согласно Кэботу обозначены SEQ ID NO: 68-70, соответственно.

[0322] В таблице 3 представлены CDR 6A10 согласно определениям Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота (также называют в настоящем документе «сводное определение Кэбота/Чотиа»), AbM и контактному определению.

5

Таблица 3

CDR 6A10 согласно определению Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота, AbM и контактному определению

Петля	Кэбот	Чотиа	Сводное определение Чотиа и Кэбота	AbM	Контактное определение
L1	L24--L34 SEQ ID NO:68	L24--L34 SEQ ID NO:68	L24--L34 SEQ ID NO:68	L24--L34 SEQ ID NO:68	L30--L36 SEQ ID NO:78
L2	L50--L56 SEQ ID NO:69	L50--L56 SEQ ID NO:69	L50--L56 SEQ ID NO:69	L50--L56 SEQ ID NO:69	L46--L55 SEQ ID NO:79
L3	L89--L97 SEQ ID NO:70	L89--L97 SEQ ID NO:70	L89--L97 SEQ ID NO:70	L89--L97 SEQ ID NO: 70	L89--L96 SEQ ID NO:80
H1	H31--H35B SEQ ID NO:71	H26--H32..H34* SEQ ID NO:72	H26--H35B* SEQ ID NO:65	H26--H35B SEQ ID NO:65	H30--H35B SEQ ID NO:73
H2	H50--H65 SEQ ID NO:66	H52--H56 SEQ ID NO:74	H50--H65 SEQ ID NO:66	H50--H58 SEQ ID NO:75	H47--H58 SEQ ID NO:76
H3	H95--H102 SEQ ID NO:67	H95--H102SEQ ID NO:67	H95--H102 SEQ ID NO:67	H95--H102 SEQ ID NO:67	H93--H101 SEQ ID NO:77

[0323] CDR тяжелой цепи 8A4 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа обозначены SEQ ID NO: 93-95, соответственно, и CDR легкой цепи 8A4 согласно Кэботу обозначены SEQ ID NO: 96-98, соответственно.

- 5 **[0324]** В таблице 4 представлены CDR 8A4 согласно определениям Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота (также называют в настоящем документе «сводное определение Кэбота/Чотиа»), AbM и контактному определению.

Таблица 4

CDR 8A4 согласно определению Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота, AbM и контактному определению

Петля	Кэбот	Чотиа	Сводное определение Чотиа и Кэбота	AbM	Контактное определение
L1	L24--L34 SEQ ID NO:96	L24--L34 SEQ ID NO:96	L24--L34 SEQ ID NO:96	L24--L34 SEQ ID NO:96	L30--L36 SEQ ID NO:106
L2	L50--L56 SEQ ID NO:97	L50--L56 SEQ ID NO:97	L50--L56 SEQ ID NO: 97	L50--L56 SEQ ID NO:97	L46--L55 SEQ ID NO:107
L3	L89--L97 SEQ ID NO:98	L89--L97 SEQ ID NO:98	L89--L97 SEQ ID NO:98	L89--L97 SEQ ID NO:98	L89--L96 SEQ ID NO:108
H1	H31--H35B SEQ ID NO:99	H26--H32..H34* SEQ ID NO:100	H26--H35B* SEQ ID NO:93	H26--H35B SEQ ID NO:93	H30--H35B SEQ ID NO:101
H2	H50--H65 SEQ ID NO:94	H52--H56 SEQ ID NO:102	H50--H65 SEQ ID NO:94	H50--H58 SEQ ID NO:103	H47--H58 SEQ ID NO:104
H3	H95--H102 SEQ ID NO:95	H95--H102 SEQ ID NO:95	H95--H102 SEQ ID NO:95	H95--H102 SEQ ID NO:95	H93--H101 SEQ ID NO:105

[0325] CDR тяжелой цепи 7G6 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа обозначены SEQ ID NO: 121-123, соответственно, и CDR легкой цепи 7G6 согласно Кэботу обозначены SEQ ID NO: 124-126, соответственно.

[0326] В таблице 5 представлены CDR 7G6 согласно определениям Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота (также называют в настоящем документе «сводное определение Кэбота/Чотиа»), AbM и контактному определению.

Таблица 5

CDR 7G6 согласно определению Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота, AbM и контактному определению

Петля	Кэбот	Чотиа	Сводное определение Чотиа и Кэбота	AbM	Контактное определение
L1	L24--L34 SEQ ID NO:124	L24--L34 SEQ ID NO:124	L24--L34 SEQ ID NO:124	L24--L34 SEQ ID NO:124	L30--L36 SEQ ID NO:134
L2	L50--L56 SEQ ID NO:125	L50--L56 SEQ ID NO:125	L50--L56 SEQ ID NO: 125	L50--L56 SEQ ID NO:125	L46--L55 SEQ ID NO:135
L3	L89--L97 SEQ ID NO:126	L89--L97 SEQ ID NO:126	L89--L97 SEQ ID NO:126	L89--L97 SEQ ID NO:126	L89--L96 SEQ ID NO:136
H1	H31--H35B SEQ ID NO:127	H26--H32..H34* SEQ ID NO:128	H26--H35B* SEQ ID NO:121	H26--H35B SEQ ID NO:121	H30--H35B SEQ ID NO:129
H2	H50--H65 SEQ ID NO:122	H52--H56 SEQ ID NO:130	H50--H65 SEQ ID NO:122	H50--H58 SEQ ID NO:131	H47--H58 SEQ ID NO: 132
H3	H95--H102 SEQ ID NO:123	H95--H102 SEQ ID NO: 123	H95--H102 SEQ ID NO:123	H95--H102 SEQ ID NO:123	H93--H101 SEQ ID NO:133

[0327] Другие антитела можно получить посредством мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи иллюстративного антитела, такого как 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 или 3D6. Моноклональные антитела, которые по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6 по аминокислотной последовательности зрелых вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепей и сохраняют их функциональные свойства, и/или которые отличаются от соответствующего антитела небольшим количеством функционально несущественных замен аминокислот (например, консервативных замен), делеций или вставок, также включены в настоящее изобретение. Также включены моноклональные антитела, содержащие по меньшей мере один или все шесть CDR согласно любому общепринятому определению, но, предпочтительно, согласно Кэботу, которые на 90%, 95%, 99% или 100% идентичны соответствующим CDR 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6.

[0328] В настоящем изобретении также предложены антитела, содержащие некоторые или все (например, 3, 4, 5 и 6) CDR, полученные полностью или по существу из 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6. Такие антитела могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит по меньшей мере два, но обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из вариабельной области тяжелой цепи 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6, и/или вариабельную область легкой цепи, которая содержит по меньшей мере два, но обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из вариабельной области легкой цепи 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6. Антитела могут содержать как тяжелую, так и легкую цепи. CDR по существу получен из соответствующего CDR 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6, когда он содержит не более 4, 3, 2 или 1 замен, вставок или делеций, за исключением того, что CDR-H2 (при определении согласно Кэботу) может содержать не более 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен, вставок или делеций. Такие антитела могут характеризоваться идентичностью по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6 аминокислотной последовательности зрелых вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепей и сохранять их функциональные свойства, и/или могут отличаться от 5G8 небольшим количеством функционально несущественных замен аминокислот (например, консервативных замен), делеций или вставок.

[0329] Некоторые антитела, идентифицированные в таких анализах, могут связываться с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными, фосфорилированными или нефосфорилированными формами тау или иными формами. Аналогично, некоторые антитела являются иммунологически реактивными в отношении непатологической и патологической формы и конформаций тау.

В. Антитела, отличные от антител человека

[0330] Получение других антител, отличных от антител человека, например, мыши, морской свинки, примата, кролика или крысы, против тау или его фрагмента можно осуществить посредством, например, иммунизации животного тау или его фрагментом.

- 5 См. руководство Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (включено посредством ссылки для всех целей). Такой иммуноген можно получить из природного источника, посредством пептидного синтеза или посредством рекомбинантной экспрессии. Необязательно, иммуноген можно вводить слитым с белком-носителем или в иным способом образованном комплексе с белком-носителем.
- 10 Необязательно, иммуноген можно вводить с адъювантом. Можно применять несколько типов адъювантов, как описано ниже. Для иммунизации лабораторных животных предпочтительным является полный адъювант Фрейнда с последующим использованием неполного адъюванта. Для получения поликлональных антител, как правило, применяют кроликов или морских свинок. Для получения моноклональных антител, как правило,
- 15 применяют мышей. Проводят скрининг антител в отношении специфичного связывания с тау или с эпитопом в пределах тау. Такой скрининг можно осуществить посредством определения связывания антитела с совокупностью вариантов тау и определения того, какие варианты тау связываются с антителом. Связывание можно оценить, например, методом вестернблоттинга, FACS или ELISA.

20 .

С. Гуманизированные антитела

- [0331] Гуманизированное антитело представляет собой генноинженерное антитело, в котором CDR от «донорного» антитела, отличного от антитела человека, переносят в «акцепторные» последовательности антитела человека (см., например, публикации Queen,
- 25 US 5,530,101 и 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; и Foote, US 6,881,557). Последовательности акцепторного антитела могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, объединение таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антитела человека или последовательность зародышевой области. Таким образом,
- 30 гуманизированное антитело представляет собой антитело, содержащее по меньшей мере три, четыре, пять или все CDR, полученные полностью или по существу из донорного антитела, и последовательности каркасного участка вариабельной области и константные области, в случае присутствия, полученные полностью или по существу из последовательностей антитела человека. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь
- 35 содержит по меньшей мере один, два и обычно все три CDR, полученные полностью или

по существу из тяжелой цепи донорного антитела, и последовательность каркасного участка вариабельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, в случае присутствия, полученные по существу из последовательностей каркасного участка вариабельной области и константной области тяжелой цепи человека. Аналогично, гуманизированная легкая цепь содержит по меньшей мере один, два и обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела, и последовательность каркасного участка вариабельной области легкой цепи и константную область легкой цепи, в случае присутствия, полученные по существу из последовательностей каркасного участка вариабельной области и константной области легкой цепи человека. В отличие от нанотел и dAb, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе получены по существу из соответствующего CDR в антителе, отличном от антитела человека, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (согласно любому общепринятому определению, но, предпочтительно, определенных согласно Кэботу) являются идентичными между соответствующими CDR. Последовательности каркасного участка вариабельной области цепи антитела или константная область цепи антитела получены по существу из последовательности каркасного участка вариабельной области человека или константной области человека, соответственно, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных согласно Кэботу, являются идентичными. Для классификации в качестве гуманизированного в соответствии с определением гуманизированных антител согласно международным непатентованным наименованиям (МНН) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) от 2014 г., антитело должно характеризоваться идентичностью по меньшей мере 85% с последовательностями антитела зародышевой линии человека (т.е. до соматической гипермутации). Смешанные антитела представляют собой антитела, в которых одна цепь антитела (например, тяжелая цепь) соответствует предельному значению, но другая цепь (например, легкая цепь) не соответствует предельному значению. Антитело классифицируют как химерное, если ни одна из цепей не соответствует предельному значению, даже если каркасные участки вариабельной области для обеих цепей были получены по существу от человека с некоторыми обратными мутациями мыши. См. публикацию Jones et al. (2016) The INNs and outs of antibody nonproprietary names, mAbs 8:1, 1-9, DOI: 10.1080/19420862.2015.1114320. См. также публикацию "WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)" (интернет) 2014. Доступна по адресу <http://www.>

who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf), включена в настоящий документ посредством ссылки. Во избежание сомнений термин «гуманизированное» в настоящем документе не ограничен определением гуманизированных антител согласно МНН ВОЗ 2014 г. Некоторые из гуманизированных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности по меньшей мере 85% последовательностям зародышевой линии человека, и некоторые из гуманизированных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности менее 85% последовательностям зародышевой линии человека. Некоторые из тяжелых цепей гуманизированных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности от приблизительно 60% до 100% с последовательностями зародышевой линии человека, такие как, например, в диапазоне от приблизительно 60% до 69%, от 70% до 79%, от 80% до 84% или от 85% до 89%. Некоторые тяжелые цепи не дотягивают до определения согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются, например, идентичностью последовательности приблизительно 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81% или 82%, 83% или 84% с последовательностями зародышевой линии человека, тогда как другие тяжелые цепи соответствуют определению согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или большей идентичностью последовательности с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые из легких цепей гуманизированных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности от приблизительно 60% до 100% с последовательностями зародышевой линии человека, такими как, например, в диапазоне от приблизительно 80% до 84% или от 85% до 89%. Некоторые легкие цепи не дотягивают до определения согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются, например, идентичностью последовательности приблизительно 81%, 82%, 83% или 84% с последовательностями зародышевой линии человека, тогда как другие легкие цепи соответствуют определению согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или большей идентичностью последовательности с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в настоящем документе, которые являются «химерными» в соответствии с определением согласно МНН ВОЗ 2014 г., содержат тяжелые цепи с идентичностью менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренные с легкими цепями, которые характеризуются идентичностью менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в настоящем документе, являются «смешанными» в соответствии с определением согласно

МНН ВОЗ 2014 г., например, содержат тяжелую цепь с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренную с легкой цепью, которая характеризуется идентичностью последовательности менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека, или наоборот. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в настоящем документе, соответствуют определению «гуманизированного» антитела согласно МНН ВОЗ 2014 г. и содержат тяжелую цепь с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренную с легкой цепью, которая характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека. Иллюстративные антитела 5G8, которые соответствуют определению «гуманизированных» согласно МНН ВОЗ 2014 г., включают антитела, содержащие зрелую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, спаренную со зрелой легкой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45 или SEQ ID NO:46. Дополнительные гуманизированные антитела 5G8 согласно настоящему изобретению включают антитела, содержащие зрелую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 33-40, спаренную со зрелой легкой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 41-46. Гуманизированные антитела 6A10 согласно настоящему изобретению включают антитела, содержащие зрелую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85-87, спаренную со зрелой легкой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 88-90. Гуманизированные антитела 8A4 согласно настоящему изобретению включают антитела, содержащие зрелую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 113-115, спаренную со зрелой легкой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 116-118. Гуманизированные антитела 7G6 согласно настоящему изобретению включают антитела, содержащие зрелую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 139-140, спаренную со зрелой легкой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 141-148.

[0332] Несмотря на то, что гуманизированные антитела часто содержат все шесть CDR (определенных согласно любому общепринятому определению, но, предпочтительно, согласно определению Кэбота) из антитела мыши, их также можно получить не со всеми CDR (например, по меньшей мере с 3, 4 или 5 CDR) из антитела мыши (например, Pascalis

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

[0333] В некоторых антителах только часть CDR, а именно подгруппа остатков CDR, необходимых для связывания, обозначаемых SDR, необходимы для сохранения связывания в гуманизированном антителе. Остатки CDR, не осуществляющие контакт с антигеном и не относящиеся к SDR, можно идентифицировать на основании предшествующих исследований (например, остатки H60 – H65 в CDR H2 часто не являются необходимыми), из областей CDR согласно Кэботу, лежащих за пределами гипервариабельных петель Чотиа (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), методом молекулярного моделирования и/или эмпирически, или как описано в публикации Gonzales *et al.*, *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. В таких гуманизированных антителах в положениях, в которых отсутствуют один или несколько донорных остатков CDR или в которых пропущен весь донорный CDR, аминокислота, занимающая положение, может представлять собой аминокислоту, занимающую соответствующее положение (согласно нумерации Кэбота) в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замен акцептора аминокислотами донора в CDR для включения отражает баланс конкурирующих соображений. Такие замены являются потенциально благоприятными для снижения количества аминокислот мыши в гуманизированном антителе и, как следствие, снижения потенциальной иммуногенности, и/или для соответствия определению «гуманизированного» антитела согласно МНН ВОЗ. Однако замены могут также вызывать изменения аффинности, и значительного снижения аффинности, предпочтительно, избегают. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замещения также можно выбрать эмпирически.

[0334] Последовательности акцепторного антитела человека можно необязательно выбрать среди множества известных последовательностей антитела человека для получения высокой степени идентичности последовательности (например, идентичности 65 – 85%) между каркасными участками вариабельной области акцепторной последовательности человека и соответствующими каркасными участками вариабельной области цепи донорного антитела.

[0335] Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи 5G8 представляет собой гуманизированную aDabi-Fab2b-VH против дабигатрана с учетным кодом NCBI 4YHM_H (SEQ ID NO:28). Другой пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи 5G8 представляет собой ген зародышевой линии человека IGHV1-46 с учетным кодом NCBI P01743.2 (SEQ ID NO:29). Пример акцепторной последовательности для легкой цепи 5G8 представляет собой гуманизированную aDabi-Fab2b-VL против

дабигатрана с учетным кодом NCBI 4YHM_L (SEQ ID NO:31). Другой пример акцепторной последовательности для легкой цепи 5G8 представляет собой ген зародышевой линии человека IGKV2-29 с учетным кодом NCBI A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32).

- 5 **[0336]** Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи 6A10 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи человека с учетным № ACR16112 (SEQ ID NO:81). Пример акцепторной последовательности для легкой цепи 6A10 представляет собой вариабельную область легкой цепи каппа человека с учетным № ABC66863 (SEQ ID NO:83).
- 10 **[0337]** Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи 8A4 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи человека с учетным № ADU57742 (SEQ ID NO:110). Пример акцепторной последовательности для легкой цепи 8A4 представляет собой вариабельную область легкой цепи каппа человека с учетным № ABA26100 (SEQ ID NO:112).
- 15 **[0338]** Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи 7G6 представляет собой область VH антитела человека с учетным № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137). Пример акцепторной последовательности для легкой цепи 7G6 представляет собой область VL антитела человека с учетным № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138).
- 20 **[0339]** Если выбирают более одной акцепторной последовательности антитела человека, можно применять объединение или гибрид данных акцепторов, и аминокислоты, используемые в различных положениях в гуманизированных вариабельных областях легкой цепи и тяжелой цепи, могут быть взяты из любой из используемых последовательностей акцепторного антитела человека.
- 25 **[0340]** Определенные аминокислоты из каркасных остатков вариабельной области человека можно выбрать для замещения на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных влияний осуществляют посредством моделирования, изучения характеристик аминокислот в конкретных расположениях или эмпирического наблюдения за эффектами замены или мутагенеза конкретных аминокислот.
- 30 **[0341]** Например, когда аминокислота отличается между каркасным остатком вариабельной области мыши и выбранным каркасным остатком вариабельной области человека, каркасную аминокислоту человека можно заменить эквивалентной каркасной аминокислотой из антитела мыши, когда обоснованно ожидают, что аминокислота:

(1) нековалентно напрямую связывается с антигеном;

(2) прилегает к участку CDR или в пределах CDR согласно определению Чотиа, но не Кэбота;

(3) иным способом взаимодействует с участком CDR (например, находится в пределах приблизительно 6 Å от участка CDR) (например, что идентифицировано посредством моделирования легкой или тяжелой цепи на расшифрованной структуре гомологичной известной цепи иммуноглобулина); или

(4) представляет собой остаток, участвующий в поверхности взаимодействия VL-VH.

[0342] В настоящем изобретении предложены гуманизированные формы антитела 5G8 мыши, включая 8 иллюстративных гуманизированных зрелых переменных областей тяжелой цепи (hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33), hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34), hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35), hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36), hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37), hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38), hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39) и hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)) и 6 иллюстративных гуманизированных зрелых переменных областей легкой цепи (hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41), hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42), hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43), hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44), hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45) и hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)).

[0343] В настоящем изобретении предложены гуманизированные формы антитела 6A10 мыши, включая 3 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области тяжелой цепи (hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85), hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86) и hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)) и 3 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области легкой цепи (hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88), hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89) и hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)).

[0344] В настоящем изобретении предложены гуманизированные формы антитела 8A4 мыши, включая 3 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области тяжелой цепи (hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113), hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114) и hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)) и 3 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области легкой цепи (hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116), hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117) и hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)).

[0345] В настоящем изобретении предложены гуманизированные формы антитела 7G6 мыши, включая 2 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области тяжелой цепи (hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139) и hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)) и 8 иллюстративных гуманизированных зрелых переменных областей легкой цепи (hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141), hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142), hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143),

hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144), hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145), hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146), hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147) и hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)).

[0346] Согласно варианту реализации гуманизированные последовательности получены с применением двухэтапного протокола ПЦР, который позволяет вводить несколько мутаций, делеций и вставок с применением сайт-направленного мутагенеза QuikChange [Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) *BioTechniques* 26:680-682)].

[0347] Каркасные остатки из классов с (1) по (3) согласно определению Queen, US 5,530,101 иногда в качестве альтернативы называют каноническими и верньерными остатками. Каркасные остатки, которые помогают определить конформацию петли CDR, иногда называют каноническими остатками (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Thornton & Martin, *J. Mol. Biol.* 263:800-815 (1996)). Каркасные остатки, которые поддерживают конформацию антигенсвязывающей петли и играют роль в тонкой настройке соответствия антитела антигену, иногда называют верньерными остатками (Foote & Winter, *J. Mol. Biol.* 224:487-499 (1992)).

[0348] Другие каркасные остатки, которые являются кандидатами для замены, представляют собой остатки, образующие потенциальный сайт гликозилирования. Еще одними кандидатами для замены являются акцепторные каркасные аминокислоты человека, которые являются необычными для иммуноглобулина человека в данном положении. Данные аминокислоты можно заменить аминокислотами из эквивалентного положения донорного антитела мыши или из эквивалентного положения более типичных иммуноглобулинов человека.

[0349] Другие каркасные остатки, которые являются кандидатами для замены, представляют собой N-концевые остатки глутамина (Q), которые можно заменить глутаминовой кислотой (E) для минимизации возможности конверсии пироглутамата [Y. Diana Liu, et al., 2011, *J. Biol. Chem.*, 286: 11211–11217]. Конверсия глутаминовой кислоты (E) в пироглутамат (pE) происходит более медленно, чем глутамина (Q). В связи с утратой первичного амина при конверсии глутамина в pE антитела становятся более кислыми. В результате неполной конверсии в антителе возникает гетерогенность, которую можно наблюдать в виде множества пиков с применением аналитических способов на основе заряда. Различия в гетерогенности могут свидетельствовать о недостаточном контроле процесса. Иллюстративные гуманизированные антитела с N-концевыми заменами глутамина на глутамат представляют собой SEQ ID NO:35 (hu5G8-VH_v3), SEQ ID NO:36 (hu5G8-VH_v4), SEQ ID NO:37 (hu5G8-VH_v5), SEQ ID NO:38 (hu5G8-VH_v6) и SEQ ID NO:40 (hu5G8-VH_v8).

[0350] Иллюстративные гуманизированные антитела представляют собой гуманизированные формы 5G8 мыши, обозначенные Hu5G8.

[0351] Антитело 5G8 мыши содержит зрелые переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые содержат SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO:8, соответственно. В настоящем изобретении предложены 8 иллюстративных гуманизированных зрелых переменных областей тяжелой цепи: hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7 и hu5G8-VH_v8. В настоящем изобретении также предложены 6 иллюстративных зрелых переменных областей легкой цепи человека: hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5 и hu5G8-VL_v6. Представлены выравнивания 5G8 мыши и различных гуманизированных антител для переменных областей легкой цепи (таблица 6 и фигура 6) и для переменных областей тяжелой цепи (таблица 7 и фигура 5).

[0352] По причинам, таким как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, представление собой сайта для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, представление собой необычного остатка для своего положения в последовательности переменной области человека и вследствие этого – потенциально иммуногенного, приобретение потенциала агрегации, и по другим причинам следующие 23 каркасные положения 5G8 считали кандидатами для замены в 6 иллюстративных зрелых переменных областях легкой цепи человека и 8 иллюстративных зрелых переменных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примере 6: L2 (I2V), L7 (T7S), L17 (Q17E), L36 (Y36L), L45 (K45Q), L46 (G46R), L70 (G70D), H1 (Q1E), H11 (V11L), H12 (K12V), H19 (K19R), H20 (V20L), H23 (K23A), H46 (E46D), H48 (M48I), H66 (K66R), H67 (A67V), H71 (R71S), H76 (S76N), H78 (A78V), H80 (M80L), H93 (T93S или T93A), H94 (I94P или I94R).

[0353] Здесь, как и в другом месте, упомянутый первым остаток представляет собой остаток гуманизированного антитела, образованный посредством переноса CDR согласно Кэботу или CDR согласно сводному определению Чотиа-Кэбота в случае CDR-H1 в акцепторный каркасный участок человека, и упомянутый вторым остаток представляет собой остаток, рассматриваемый для замены такого остатка. Таким образом, в пределах каркасных участков переменной области упомянутый первым остаток представляет собой остаток человека, а в пределах CDR упомянутый первым остаток представляет собой остаток мыши.

[0354] Иллюстративные антитела включают любые пермутации или комбинации иллюстративных зрелых вариабельных областей тяжелой и легкой цепей 5G8, например, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v5 или hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v6.

[0355] В настоящем изобретении предложены варианты гуманизированного антитела 5G8, в которых гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7 и hu5G8-VH_v8. (SEQ ID NO: 33-40), и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5 и hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO: 41-46). В некоторых таких антителах сохраняется по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или все 23 из обратных мутаций или других мутаций, обнаруженных в SEQ ID NO:33-40 и SEQ ID NO:41-46.

[0356] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: Н48 занимает I, Н71 занимает S, Н93 занимает S, и Н94 занимает Р. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения Н48, Н71, Н93 и Н94 в области VH занимает I, S, S и Р, соответственно

[0357] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: Н1 занимает Е, Н48 занимает

I, H71 занимает S, H93 занимает S, и H94 занимает P. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает E, I, S, S и P, соответственно.

[0358] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из
5 следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H46 занимает D, H48 занимает I, H71 занимает S, H93 занимает S, и H94 занимает P. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H46, H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает E, D, I, S, S и P, соответственно.

[0359] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из
10 следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H11 занимает L, H12 занимает V, H19 занимает R, H20 занимает L, H46 занимает D, H48 занимает I, H71 занимает S, H76 занимает N, H80 занимает L, H93 занимает S, и H94 занимает P. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93 и H94 в области VH занимает E, L, V, R, L, D, I, S, N, L, S и P,
15 соответственно.

[0360] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из
следующих положений занимает аминокислота, как указано: H66 занимает R, H67
занимает V, и H78 занимает V. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения
H66, H67, и H78 в области VH занимает R, V и V, соответственно.

[0361] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из
20 следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1 занимает Q или E, H11
занимает V или L, H12 занимает K или V, H19 занимает K или R, H20 занимает V или L,
H23 занимает K или A, H46 занимает E или D, H48 занимает M или I, H66 занимает K или
R, H67 занимает A или V, H71 занимает R или S, H76 занимает S или N, H78 занимает A
25 или V, H80 занимает M или L, H93 занимает T, S или A, и H94 занимает I, P или R.

[0362] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H48, H71, H93 и H94 в
области VH занимает I, S, S и P, соответственно, как в hu5G8-VH_v2. В некоторых
гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H48, H71, H93 и H94 в области VH
занимает E, I, S, S и P, соответственно, как в hu5G8-VH_v3. В некоторых
30 гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H46, H48, H71, H93 и H94 в области VH
занимает E, D, I, S, S и P, соответственно, как в hu5G8-VH_v4. В некоторых
гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71,
H76, H80, H93 и H94 в области VH занимает E, L, V, R, L, D, I, S, N, L, S и P,
соответственно, как в hu5G8-VH_v5. В некоторых гуманизированных антителах 5G8
35 положения H1, H11, H12, H19, H20, H23, H46, H48, H71, H76, H80, H93 и H94 в области

VH занимает E, L, V, R, L, A, D, I, S, N, L, S и P, соответственно, как в hu5G8-VH_v6. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H66, H67, H78, H93 и H94 в области VH занимает R, V, V, A и R, соответственно, как в hu5G8-VH_v7. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H46, H48, H66, H67, H71, H78, H93 и H94 в области VH занимает E, D, I, R, V, S, V, S и P, соответственно, как в hu5G8-VH_v8.

[0363] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает V, L36 занимает L, и L46 занимает R. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения L2, L36 и L46 в области VL занимает V, L и R, соответственно.

[0364] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает V, L36 занимает L, L46 занимает R, и L70 занимает D. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения L2, L36, L46 и L70 в области VL занимает V, L, R и D, соответственно.

[0365] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L45 занимает Q, и L70 занимает D. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения L45 и L70 в области VL занимает Q и D, соответственно

[0366] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает I или V, L7 занимает T или S, L17 занимает Q или E, L36 занимает Y или L, L45 занимает K или Q, L46 занимает L или R, и L70 занимает G или D.

[0367] В некоторых гуманизированных антителах 5G8 предложенные положения L2, L36, L46 в области VL занимает V, L и R, соответственно, как в hu5G8-VL_v2. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения L2, L36, L46 и L70 в области VL занимает V, L, R и D, соответственно, как в hu5G8-VL_v3. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения L2, L7, L17, L36, L46 и L70 в области VL занимает V, S, E, L, R и D, соответственно, как в hu5G8-VL_v4. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения L45 и L70 в области VL занимает Q и D, соответственно, как в hu5G8-VL_v5. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения L2, L36, L45, L46, L70 в области VL занимает V, L, Q, R и D, соответственно, как в hu5G8-VL_v6.

[0368] Иллюстративные гуманизированные антитела представляют собой гуманизированные формы 6A10 мыши, обозначенные Hu6A10.

[0369] Антитело 6A10 мыши содержит зрелые переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые содержат SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO:64, соответственно. В настоящем изобретении предложены 3

иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области тяжелой цепи 6A10: hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2 и hu6A10-VH_v3. В настоящем изобретении также предложены 3 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области легкой цепи 6A10: hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2 и hu6A10-VL_v3. Представлены выравнивания 5 6A10 мыши и различных гуманизированных антител для переменных областей легкой цепи (таблица 12 и фигура 8) и для переменных областей тяжелой цепи (таблица 13 и фигура 7).

[0370] По причинам, таким как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, представление собой сайта для желательной или 10 нежелательной посттрансляционной модификации, представление собой необычного остатка для своего положения в последовательности переменной области человека и вследствие этого – потенциально иммуногенного, приобретение потенциала агрегации, и по другим причинам следующие 7 каркасных положений переменной области посчитали 15 кандидатами для замен в 3 иллюстративных зрелых переменных областях легкой цепи человека и 3 иллюстративных зрелых переменных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примере 7: L12 (P12S), L17 (Q17E), L46 (R46L), H16 (A16G), H48 (M48I), H69 (T69I) и H80 (M80L).

[0371] Здесь, как и в другом месте, упомянутый первым остаток представляет собой 20 остаток гуманизированного антитела, образованный посредством переноса CDR согласно Кэботу или CDR согласно сводному определению Чотиа-Кэбота в случае CDR-H1 в акцепторный каркасный участок человека, и упомянутый вторым остаток представляет собой остаток, рассматриваемый для замены такого остатка. Таким образом, в пределах каркасных участков переменной области упомянутый первым остаток представляет 25 собой остаток человека, а в пределах CDR упомянутый первым остаток представляет собой остаток мыши..

[0372] Иллюстративные антитела 6A10 включают любые пермутации или комбинации иллюстративных зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей, например, hu6A10VH_v1/ hu6A10VL_v1, hu6A10VH_v1/ hu6A10VL_v2, hu6A10VH_v1/ 30 hu6A10VL_v3, hu6A10VH_v2/ hu6A10VL_v1, hu6A10VH_v2/ hu6A10VL_v2, hu6A10VH_v2/ hu6A10VL_v3, hu6A10VH_v3/ hu6A10VL_v1, hu6A10VH_v3/ hu6A10VL_v2 или hu6A10VH_v3/ hu6A10VL_v3.

[0373] В настоящем изобретении предложены варианты гуманизированного антитела 6A10, в которых гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи 35 демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с

hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2 и hu6A10-VH_v3, (SEQ ID NO: 85-87), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2, hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO: 88-90). В некоторых таких антителах сохраняется по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или все 7 из обратных мутаций или других мутаций, обнаруженных в SEQ ID NO:85-87 и SEQ ID NO:88-90.

[0374] В некоторых гуманизованных антителах 6A10 положение H48 в области VH занимает I.

[0375] В некоторых гуманизованных антителах 6A10 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H16 занимает A или G, H48 занимает M или I, H69 занимает T или I, и H80 занимает M или L.

[0376] В некоторых гуманизованных антителах 6A10 положение H48 в области VH занимает I, как в hu6A10-VH_v2. В некоторых гуманизованных антителах 6A10 положения H16, H48, H69 и H80 в области VH занимает G, I, I и L, соответственно, как в hu6A10-VH_v3.

[0377] В некоторых гуманизованных антителах 6A10 положение L46 в области VL занимает L.

[0378] В некоторых гуманизованных антителах 6A10 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает P или S, L17 занимает Q или E, и L46 занимает R или L.

[0379] В некоторых гуманизованных антителах 6A10 положение L46 в области VL занимает L, как в hu6A10-VL_v2. В некоторых гуманизованных антителах 6A10 положения L12, L17 и L46 в области VL занимает S, E и L, соответственно, как в hu6A10-VL_v3.

[0380] Иллюстративные гуманизованные антитела представляют собой гуманизованные формы 8A4 мыши, обозначенные Hu8A4.

[0381] Антитело 8A4 мыши содержит зрелые переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые содержат SEQ ID NO:91 и SEQ ID NO:92, соответственно. В настоящем изобретении предложены 3 иллюстративные гуманизованные зрелые переменные области тяжелой цепи: hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2 и hu8A4-VH_v3. В настоящем изобретении также предложены 3 иллюстративные зрелые переменные области легкой цепи человека: hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2 и hu8A4-VL_v3. Представлены выравнивания 8A4 мыши и различных гуманизованных антител для переменных областей легкой цепи (таблица 18 и фигура 10) и для переменных областей тяжелой цепи (таблица 19 и фигура 9).

[0382] По причинам, таким как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, представление собой сайта для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, представление собой необычного остатка для своего положения в последовательности варибельной области человека и вследствие этого – потенциально иммуногенного, приобретение потенциала агрегации, и по другим причинам следующие 11 каркасных положений варибельной области 8A4 посчитали кандидатами для замен в 3 иллюстративных зрелых варибельных областях легкой цепи человека и 3 иллюстративных зрелых варибельных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примере 8: L2 (I2V), L17 (Q17E), L36 (F36L), H12 (K12V), H16 (S16G), H20 (V20L), H48 (M48I), H67 (I67A), H68 (N68T), H85 (D85E) и H93 (A93S).

[0383] Здесь, как и в другом месте, упомянутый первым остаток представляет собой остаток гуманизированного антитела, образованный посредством переноса CDR согласно Кэботу или CDR согласно сводному определению Чотиа-Кэбота в случае CDR-H1 в акцепторный каркасный участок человека, и упомянутый вторым остаток представляет собой остаток, рассматриваемый для замены такого остатка. Таким образом, в пределах каркасных участков варибельной области упомянутый первым остаток представляет собой остаток человека, а в пределах CDR упомянутый первым остаток представляет собой остаток мыши..

[0384] Иллюстративные антитела 8A4 включают любые пермутации или комбинации иллюстративных зрелых варибельных областей тяжелой и легкой цепей, например, hu8A4VH_v1/ hu8A4VL_v1, hu8A4VH_v1/ hu8A4VL_v2, hu8A4VH_v1/ hu8A4VL_v3, hu8A4VH_v2/ hu8A4VL_v1, hu8A4VH_v2/ hu8A4VL_v2, hu8A4VH_v2/ hu8A4VL_v3, hu8A4VH_v3/ hu8A4VL_v1, hu8A4VH_v3/ hu8A4VL_v2 или hu8A4VH_v3/ hu8A4VL_v3.

[0385] В настоящем изобретении предложены варианты гуманизированного антитела 8A4, в которых гуманизированная зрелая варибельная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2 и hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO: 113-115), и гуманизированная зрелая варибельная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2, hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO: 116-118). В некоторых таких антителах сохраняется по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 из обратных мутаций или других мутаций, обнаруженных в SEQ ID NO:113-115 и SEQ ID NO:116-118.

[0386] В некоторых гуманизированных антителах 8A4 положение H93 в области VH занимает S.

[0387] В некоторых гуманизированных антителах 8A4 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает V, H16 занимает G, H20 занимает L, и H68 занимает T. В некоторых гуманизированных антителах 8A4 положения H12, H16, H20 и H68 в области VH занимает V, G, L и T, соответственно.

[0388] В некоторых гуманизированных антителах 8A4 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает K или V, H16 занимает S или G, H20 занимает V или L, H48 занимает M или I, H67 занимает A или I, H68 занимает N или T, H85 занимает D или E, и H93 занимает S или A.

[0389] В некоторых гуманизированных антителах 8A4 положение H93 в области VH занимает S, как в hu8A4VH_v1. В некоторых гуманизированных антителах 8A4 положение H12, положения H16, H20, H68 и H93 в области VH занимает V, G, L, T и S, соответственно, как в hu8A4VH_v2. В некоторых гуманизированных антителах 8A4 положения H12, H16, H20, H48, H67, H68 и H85 в области VH занимает V, G, L, I, A, T и E, соответственно, как в hu8A4VH_v3.

[0390] В некоторых гуманизированных антителах 8A4 положение L17 в области VL занимает E.

[0391] В некоторых гуманизированных антителах 8A4 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L2 занимает I или V, L17 занимает Q или E, и L36 занимает F или L.

[0392] В некоторых гуманизированных антителах 8A4 положение L17 в области VL занимает E, как в hu8A4-VL_v2. В некоторых гуманизированных антителах 8A4 положения L2, L17 и L36 в области VL занимает V, E и L, соответственно, как в hu8A4-VL_v3.

[0393] Иллюстративные гуманизированные антитела представляют собой гуманизированные формы 7G6 мыши, обозначенные Hu7G6.

[0394] Антитело 7G6 мыши содержит зрелые переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые содержат SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO:120, соответственно. В настоящем изобретении предложены 2 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области тяжелой цепи: hu7G6-VH_v1 и hu7G6-VH_v2. В настоящем изобретении также предложены 8 иллюстративных зрелых переменных областей легкой цепи человека: hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7 и hu7G6-VL_v8.

Представлены выравнивания 7G6 мыши и различных гуманизированных антител для переменных областей легкой цепи (таблица 25 и фигура 12) и для переменных областей тяжелой цепи (таблица 26 и фигура 11).

[0395] По причинам, таким как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, представление собой сайта для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, представление собой необычного остатка для своего положения в последовательности переменной области человека и вследствие этого – потенциально иммуногенного, приобретение потенциала агрегации, и по другим причинам следующие 16 каркасных положений переменной области 7G6 посчитали кандидатами для замены в 8 иллюстративных зрелых переменных областях легкой цепи человека и 2 иллюстративных зрелых переменных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примере 9: L12 (P12S), L36 (F36L), L37 (Q37L), L45 (R45K), L100 (Q100G), L103 (R103K), H12 (K12V), H20 (V20L), H38 (R39K), H69 (M69I), H76 (S76N), H78 (V78A), H80 (M80L), H81 (E81Q), H92 (C92S) и H93 (A93T).

[0396] Здесь, как и в другом месте, упомянутый первым остаток представляет собой остаток гуманизированного антитела, образованный посредством переноса CDR согласно Кэботу или CDR согласно сводному определению Чотиа-Кэбота в случае CDR-H1 в акцепторный каркасный участок человека, и упомянутый вторым остаток представляет собой остаток, рассматриваемый для замены такого остатка. Таким образом, в пределах каркасных участков переменной области упомянутый первым остаток представляет собой остаток человека, а в пределах CDR упомянутый первым остаток представляет собой остаток мыши.

[0397] Иллюстративные антитела 7G6 включают любые пермутации или комбинации иллюстративных зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей, например, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v1, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v2, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v3, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v4, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v5, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v6, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v7, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v8, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v1, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v2, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v3, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v4, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v5, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v6, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v7 или hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v8.

[0398] В настоящем изобретении предложены варианты гуманизированного антитела 7G6, в которых гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu7G6-VH_v1 и hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO: 139-140), и гуманизированная зрелая переменная область

легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7 и hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO: 141-148). В некоторых таких антителах сохраняется по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или
5 все 17 из обратных мутаций или других мутаций, обнаруженных в SEQ ID NO:139-140 и SEQ ID NO:141-148.

[0399] В некоторых гуманизированных антителах 7G6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает V, H20 занимает L, H69 занимает I, H76 занимает N, H78 занимает A, H80 занимает L, H81
10 занимает Q, H92 занимает S, и H93 занимает T. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 в области VH занимает V, L, I, N, A, L, Q, S и T, соответственно.

[0400] В некоторых гуманизированных антителах 7G6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает
15 K или V, H20 занимает V или L, H38 занимает R или K, H69 занимает M или I, H76 занимает S или N, H78 занимает V или A, H80 занимает M или L, H81 занимает E или Q, H92 занимает C или S, и H93 занимает A или T.

[0401] В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 в области VH занимает V, L, I, N, A, L, Q, S и T, соответственно,
20 как в hu7G6-VH_v1. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения H12, H20, H38, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 в области VH занимает V, L, K, I, N, A, L, Q, S и T, соответственно, как в hu7G6-VH_v2.

[0402] В некоторых гуманизированных антителах 7G6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает
25 S, и L103 занимает K. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12 и L103 в области VL занимает S и K, соответственно.

[0403] В некоторых гуманизированных антителах 7G6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает
30 S, L36 занимает L, и L103 занимает K. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L36 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно.

[0404] В некоторых гуманизированных антителах 7G6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает
S, L37 занимает L, и L103 занимает K. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L37 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно.

[0405] В некоторых гуманизированных антителах 7G6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L36 занимает L, L37 занимает L, и L103 занимает K. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L36, L37 и L103 в области VL занимает S, L, L и K, соответственно.

[0406] В некоторых гуманизированных антителах 7G6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L45 занимает K, и L103 занимает K. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L45 и L103 в области VL занимает S, K и K, соответственно.

[0407] В некоторых гуманизированных антителах 7G6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L100 занимает G, и L103 занимает K. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L100 и L103 в области VL занимает S, G и K, соответственно.

[0408] В некоторых гуманизированных антителах 7G6 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L36 занимает F или L, L37 занимает Q или L, L45 занимает R или K, или L100 занимает Q или G.

[0409] В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12 и L103 в области VL занимает S и K, соответственно, как в hu7G6-VL_v1. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L37 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно, как в hu7G6-VL_v2. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L36 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно, как в hu7G6-VL_v3. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L36, L37 и L103 в области VL занимает S, L, L и K, соответственно, как в hu7G6-VL_v4. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L45 и L103 в области VL занимает S, K и K, соответственно, как в hu7G6-VL_v5. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L36, L37, L45 и L103 в области VL занимает S, L, L, K и K, соответственно, как в hu7G6-VL_v6. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L100 и L103 в области VL занимает S, G и K, соответственно, как в hu7G6-VL_v7. В некоторых гуманизированных антителах 7G6 положения L12, L36, L37, L100 и L103 в области VL занимает S, L, L, G и K, соответственно, как в hu7G6-VL_v8.

[0410] В некоторых гуманизированных антителах 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 вариабельная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых гуманизированных антителах 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 вариабельная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$.

В некоторых гуманизированных антителах 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 каждая из вариабельной

области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$.

[0411] Участки CDR таких гуманизированных антител 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 могут являться идентичными или по существу идентичными участкам CDR 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6, соответственно. Участки CDR можно определить согласно любому общепринятому определению (например, Чотиа или сводному определению Чотиа и Кэбота), но, предпочтительно, они определены согласно определению Кэбота.

[0412] Каркасные положения вариабельных областей соответствуют нумерация Кэбота, если не указано обратное. Другие такие варианты, как правило, отличаются от последовательностей иллюстративных тяжелой и легкой цепей Hu5G8, Hu6A10, Hu8A4 или Hu7G6 небольшим количеством (например, как правило, не более 1, 2, 3, 5, 10 или 15) замещений, делеций или вставок.

[0413] Возможность дополнительной вариации в гуманизированных вариантах 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 заключается в дополнительных обратных мутациях в каркасных участках вариабельной области. Множество каркасных остатков, которые не осуществляют контакт с CDR в гуманизированном МАТ (моноклональном антителе), могут содержать замены аминокислот из соответствующих положений донорного МАТ мыши или других антител мыши или человека, и даже многие потенциальные осуществляющие контакт с CDR остатки также поддаются замене. Даже аминокислоты в пределах CDR можно заменить, например, остатками, обнаруженными в соответствующем положении акцепторной последовательности человека, использованной для обеспечения каркасных участков вариабельной области. Помимо этого, можно применять альтернативные акцепторные последовательности человека, например, для тяжелой и/или легкой цепей. Если применяют различные акцепторные последовательности, одну или несколько из обратных мутаций, рекомендованных выше, можно не осуществлять, поскольку соответствующие донорные и акцепторные остатки уже являются одинаковыми без обратных мутаций.

[0414] Предпочтительно, замены или обратные мутации в гуманизированных вариантах 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 (будь то консервативные или нет) не оказывают существенного эффекта в отношении аффинности связывания или активности гуманизированного МАТ, то есть, в отношении его способности связываться с тау.

[0415] Гуманизированные антитела 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 дополнительно характеризуются способностью связываться с любым или всеми из фосфорилированного тау, нефосфорилированного тау и неправильно свернутых/агрегированных форм тау. Гуманизированные антитела 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 дополнительно характеризуются способностью конкурировать с 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6 мыши за связывание с любым или

всеми из фосфорилированного тау, нефосфорилированного тау и неправильно свернутых/агрегированных форм тау.

D. Химерные и венированные антитела

[0416] В настоящем изобретении также предложены химерная и венированная формы антител, отличных от антител человека, в частности, антител 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6 согласно примерам.

[0417] Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые переменные области легкой и тяжелой цепей антитела, отличного от антитела человека (например, мыши), объединены с константными областями легкой и тяжелой цепей человека. Такие антитела по существу или полностью сохраняют специфичность связывания антитела мыши и состоят приблизительно на две трети из последовательности человека.

[0418] Венированное антитело представляет собой тип гуманизированного антитела, который сохраняет некоторые и обычно все из CDR и некоторые из каркасных остатков переменной области, отличных от остатков человека, антитела, отличного от антитела человека, но в котором другие каркасные остатки переменной области, которые могут вносить вклад в В- или Т-клеточные эпитопы, например, экспонированные остатки (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991), заменены остатками из соответствующих положений последовательности антитела человека. Результатом является антитело, в котором CDR получен полностью или по существу из антитела, отличного от антитела человека, и каркасные участки переменной области антитела, отличного от антитела человека, являются более подобными человеку благодаря заменам. Венированные формы антител 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 включены в настоящее изобретение.

E. Антитела человека

[0419] Антитела человека против тау или его фрагмента предложены посредством множества методик, описанных ниже. Некоторые антитела человека отобраны посредством конкурентных анализов связывания, посредством способа фагового дисплея согласно Winter, см. выше, или иным способом, чтобы данные антитела характеризовались той же эпитопной специфичностью, что и конкретное антитело мыши, такое как одно из моноклональных антител мыши, описанных в примерах. Можно также провести скрининг антител человека в отношении конкретной эпитопной специфичности посредством применения в качестве антигена-мишени только фрагмента тау и/или посредством проведения скрининга антител против совокупности вариантов тау.

[0420] Способы получения антител человека включают способ триомы согласно публикациям Oestberg *et al.*, *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, патент США № 4,634,664; и Engleman *et al.*, патент США 4,634,666, применение трансгенных мышей,

содержащих гены иммуноглобулина человека (см., например, публикации Lonberg *et al.*, WO93/12227 (1993); US 5,877,397; US 5,874,299; US 5,814,318; US 5,789,650; US 5,770,429; US 5,661,016; US 5,633,425; US 5,625,126; US 5,569,825; US 5,545,806; Neuberger, *Nat. Biotechnol.* 14:826 (1996); и Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)), способы фагового дисплея (см., например, публикации Dower *et al.*, WO 91/17271; McCafferty *et al.*, WO 92/01047; US 5,877,218; US 5,871,907; US 5,858,657; US 5,837,242; US 5,733,743; и US 5,565,332); и способы, описанные в публикации WO 2008/081008 (например, иммортализация В-клеток памяти, выделенных от человека, например, с помощью ВЭБ (вируса Эпштейна-Барр), проведение скрининга в отношении желаемых свойств и клонирование и экспрессия рекомбинантных форм).

F. Выбор константной области

[0421] Вариабельные области тяжелой и легкой цепей химерного, венированного или гуманизированного антител можно присоединить к по меньшей мере части константной области человека. Выбор константной области зависит отчасти от того, являются ли желательными антителозависимая опосредованная клетками цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплементзависимая цитотоксичность. Например, изотипы IgG1 и IgG3 человека характеризуются комплементзависимой цитотоксичностью, а изотипы IgG2 и IgG4 человека – не характеризуются ею. IgG1 и IgG3 человека также вызывают более мощные опосредованные клетками эффекторные функции, чем IgG2 и IgG4 человека. Константные области легких цепей могут представлять собой лямбда или каппа. Системы нумерации для константных областей включают нумерацию EU (Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969)), нумерацию Кэбота (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991), уникальную нумерацию IMGT (Lefranc M.-P. et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains*, *Dev. Comp. Immunol.*, 29, 185-203 (2005) и нумерацию экзонов IMGT (Lefranc, ссылка выше).

[0422] Одна или несколько аминокислот на амино- или карбоксильном конце легкой и/или тяжелой цепи, такие как С-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или могут быть дериватизированными в части молекул или во всех молекулах. В константные области могут быть внесены замены для снижения или повышения эффекторной функции, такой как опосредованная комплементом цитотоксичность или АЗКЦ (см., например, публикации Winter et al., патент США No. 5,624,821; Tso et al., патент США No. 5,834,597; и Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006), или для увеличения периода полужизни у человека (см., например, публикацию Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279:6213,

2004). Иллюстративные замены включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428 (в данном абзаце для константной области используется нумерация EU) для увеличения периода полужизни антитела. Замена в любом или всех положениях 234, 235, 236 и/или 237 снижает аффинность в отношении рецепторов Fcγ, в частности, рецептора FcγRI (см., например, US 6,624,821). Замену аланина в положениях 234, 235 и 237 IgG1 человека можно применять для снижения эффекторных функций. Некоторые антитела содержат замену аланина в положениях 234, 235 и 237 IgG1 человека для снижения эффекторных функций. Необязательно, положения 234, 236 и/или 237 в IgG2 человека замещены аланином, а положение 235 – глутамином (см., например, публикацию US 5,624,821). В некоторых антителах применяют мутацию в одном или нескольких из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331 IgG1 человека согласно нумерации EU. В некоторых антителах применяют мутацию в одном или нескольких из положений 318, 320 и 322 IgG1 человека согласно нумерации EU. В некоторых антителах положения 234 и/или 235 замещены аланином, и/или положение 329 замещено глицином. В некоторых антителах положения 234 и 235 замещены аланином. В некоторых антителах изотип представляет собой IgG2 или IgG4 человека.

[0423] Антитела можно экспрессировать в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv или в виде одноцепочечных антител, в которых зрелые вариабельные домены тяжелой и легкой цепей соединены посредством спейсера.

[0424] Константные области человека демонстрируют аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию между различными индивидуумами; это означает, что константные области у различных индивидуумов могут отличаться в одном или нескольких полиморфных положениях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотка, распознающая изоаллотип, связывается с неполлиморфной областью одного или нескольких других изотипов. Таким образом, например, другая константная область тяжелой цепи получена из G1m3 IgG1 с С-концевым лизином или без него. Упоминание о константной области человека включает константную область с любым природным аллотипом или любой пермутацией остатков, занимающих положения в природных аллотипах.

G. Экспрессия рекомбинантных антител

[0425] Известно множество способов получения химерных и гуманизированных антител с применением экспрессирующей антитела линии клеток (например, гибридомы). Например, вариабельные области иммуноглобулина антител можно клонировать и секвенировать с применением хорошо известных способов. В одном способе

вариабельную область VH тяжелой цепи клонируют посредством ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) с применением мРНК, полученной из клеток гибридомы. Консенсусные праймеры применяют в отношении лидерного пептида области VH, содержащего кодон инициации трансляции в качестве 5'-праймера и специфичный к константной области g2b 3'-праймер. Иллюстративные праймеры описаны в публикации патента США US 2005/0009150 автора Schenk *et al.* (здесь и далее «Schenk»). Последовательности из множества независимо полученных клонов можно сравнить, чтобы убедиться, что в течение амплификации не были введены изменения. Последовательность области VH можно также определить или подтвердить посредством секвенирования фрагмента VH, полученного посредством методологии 5'-RACE ОТ-ПЦР и 3' g2b-специфичного праймера.

[0426] Вариабельную область VL легкой цепи можно клонировать аналогичным способом. Согласно одному подходу разрабатывают набор консенсусных праймеров для амплификации областей VL с применением 5'-праймера, разработанного для гибридизации с областью VL, содержащего кодон инициации трансляции, и 3'-праймера, специфичного к области Ck, ниже по течению от соединяющей области V-J. Согласно второму подходу для клонирования кДНК, кодирующей VL, применяют методологию 5'-RACE ОТ-ПЦР. Иллюстративные праймеры описаны в публикации Schenk, ссылка выше. Затем клонированные последовательности объединяют с последовательностями, кодирующими константные области человека (или других видов, отличных от человека).

[0427] Согласно одному подходу вариабельные области тяжелой и легкой цепей переконструируют, чтобы они кодировали сплайс-донорные последовательности ниже по течению от соответствующих соединений VDJ или VJ, и клонируют в вектор экспрессии млекопитающего, такой как pCMV-h γ 1 для тяжелой цепи и pCMV-M κ 1 для легкой цепи.

Данные векторы кодируют константные области γ 1 и Ck человека в виде экзонных фрагментов ниже по течению от встроенной кассеты вариабельной области. После подтверждения последовательности клетки CHO можно котрансфицировать векторами экспрессии тяжелой цепи и легкой цепи для получения химерных антител. Кондиционированную среду собирают через 48 часов после трансфекции и анализируют методом вестернблоттинга в отношении продукции антитела или методом ELISA в отношении связывания с антигеном. Химерные антитела являются гуманизированными, как описано выше.

[0428] Химерные, венированные, гуманизированные антитела и антитела человека, как правило, получают посредством рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции, как правило, содержат последовательность контроля

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

[0429] Данные векторы экспрессии, как правило, являются реплицируемыми в организмах хозяев в виде эписом или составной части хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии содержат селективные маркеры, например, устойчивость к ампициллину или устойчивость к гигромицину, чтобы обеспечить обнаружение тех клеток, которые были трансформированы желаемыми последовательностями ДНК.

[0430] *E. coli* представляет собой один из прокариотических хозяев, пригодных для экспрессии антител, в частности, фрагментов антитела. Микроорганизмы, такие как дрожжи, также пригодны для экспрессии. *Saccharomyces* представляет собой дрожжевого хозяина с подходящими векторами, которые по желанию содержат последовательности контроля экспрессии, точку начала репликации, последовательности терминации и т.п. Типичные промоторы включают 3-фосфоглицераткиназу и другие гликолитические ферменты. Индуцибельные промоторы дрожжей включают, среди прочих, промоторы из алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома C и ферментов, отвечающих за утилизацию мальтозы и галактозы.

[0431] Клетки млекопитающих можно применять для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. руководство Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Было разработано множество подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и такие линии клеток-хозяев включают линии клеток CHO, различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и не продуцирующие антитела миеломы, включая Sp2/0 и NS0. Клетки могут являться отличными от клеток человека. Векторы экспрессии для данных клеток могут содержать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), и необходимые информационные сайты процессинга, такие как сайты связывания рибосомы, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминатора транскрипции.

Последовательности контроля экспрессии могут содержать промоторы, полученные из

эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего папилломавируса, и т.п. См. публикацию Co *et al.*, *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

[0432] В качестве альтернативы, кодирующие антитело последовательности можно встроить в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоко трансгенного животного (см., например, патент США № 5,741,957; патент США № 5,304,489; и патент США № 5,849,992). Подходящие трансгены включают кодирующие последовательности для легкой и/или тяжелой цепей, функционально связанные с промотором и энхансером из гена, специфичного к молочной железе, такого как казеин или бета-лактоглобулин.

[0433] Векторы, содержащие сегменты ДНК, представляющие интерес, можно перенести в клетку-хозяин способами, которые зависят от типа клеточного хозяина. Например, для прокариотических клеток обычно применяют трансфекцию на основе хлорида кальция, в то время как для других клеточных хозяев можно применять обработку фосфатом кальция, электропорацию, липофекцию, баллистическую трансфекцию или трансфекцию на основе вирусов. Другие способы, используемые для трансформации клеток млекопитающих, включают в себя применение полибрена, слияние протопластов, липосом, электропорацию и микроинъекцию. Для получения трансгенных животных трансгены можно микроинъектировать в оплодотворенные ооциты или можно встроить в геном эмбриональных стволовых клеток, и ядро таких клеток перенести в энуклеированные ооциты.

[0434] После введения вектора или векторов, кодирующих тяжелые и легкие цепи антитела, в клеточную культуру, можно провести скрининг пулов клеток в отношении продуктивности роста и качества продукта в бессывороточной среде. Затем пулы клеток с высокой продуктивностью можно подвергнуть одноклеточному клонированию на основе FACS для создания моноклональных линий. Можно применять удельные продуктивности более 50 пг или 100 пг на клетку в день, что соответствует титрам продукта более 7,5 г/л культуры. Антитела, продуцируемые одноклеточными клонами, также можно исследовать в отношении мутности, фильтрационных свойств методом ПААГ (электрофореза в полиакриламидном геле), ИЭФ (изоэлектрического фокусирования), сканирования в УФ-области, высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ), углеводно-олигосахаридного картирования, масс-спектрометрии и анализа связывания, такого как ELISA или Biacore. Отобранный клон можно затем использовать для создания банка клеток во множестве флаконов и хранить в замороженном виде для последующего использования.

[0435] После экспрессии антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными способами, известными в данной области техники, включая захват белком А, очистку ВЭЖХ, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п. (см., в общих чертах, руководство Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

5 [0436] Можно применять методологии для коммерческого получения антител, включая оптимизацию кодона, отбор промоторов, отбор элементов транскрипции, отбор терминаторов, бессывороточное одноклеточное клонирование, создание банков клеток, использование селективных маркеров для амплификации числа копий, терминатор СНО или улучшение титров белков (см., например, публикации US 5,786,464; US 6,114,148; US 10 6,063,598; US 7,569,339; W02004/050884; W02008/012142; W02008/012142; W02005/019442; W02008/107388; W02009/027471; и US 5,888,809).

IV. Активные иммуногены

[0437] В настоящем изобретении также предложены способы лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанные способы 15 включают введение средства, вызывающего иммунный ответ против тау. Такое средство, применяемое для активной иммунизации, выступает для индукции у пациента тех же типов антитела, как описано выше применительно к пассивной иммунизации. Некоторые такие способы включают введение субъекту иммуногена, содержащего эпитоп, с которым специфично связывается антитело 5G8, в режиме, эффективном для образования антител 20 против тау. В некоторых способах иммуноген содержит пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 5G8. В других способах вводят иммуноген, содержащий эпитоп, с которым специфично связывается антитело 6A10. В некоторых способах иммуноген содержит пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично 25 связывается антитело 6A10. В некоторых способах вводят иммуноген, содержащий эпитоп, с которым специфично связывается антитело 8A4. В некоторых способах иммуноген содержит пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 8A4. В других способах вводят иммуноген, содержащий эпитоп, с которым специфично связывается антитело 7G6. В некоторых 30 способах вводят иммуноген, содержащий эпитоп, с которым специфично связывается антитело 3D6. В некоторых способах иммуноген содержит пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 3D6. В некоторых способах вводят иммуноген, содержащий пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, причем по меньшей мере два из антител 5G8, 6A10, 35 8A4, 7G6 и 3D6 специфично связываются с пептидом тау. В некоторых способах

иммуноген содержит эпитоп, с которым специфично связывается более одного из вышеупомянутых антител, причем указанный эпитоп состоит из пептида длиной 4 – 11 смежных аминокислот из остатков 199 – 213 SEQ ID NO:3 или остатков 262 – 276 SEQ ID NO:3, или длиной 4 – 11 смежных аминокислот из остатков 199 – 213 SEQ ID NO:3 и остатков 262 – 276 SEQ ID NO:3. В некоторых способах эпитоп пептида тау состоит из 4 – 11 смежных аминокислот из остатков 199 – 213 SEQ ID NO:3 или из остатков 262 – 276 SEQ ID NO:3. В других способах эпитоп пептида тау состоит из двух смежных сегментов аминокислот: одного сегмента из остатков 199 – 213 SEQ ID NO:3, другого – из остатков 262 – 276 SEQ ID NO:3, причем два смежных сегмента в сумме состоят из 4 – 11 аминокислот.

[0438] Для индукции антител, связывающихся с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 или 3D6, можно картировать специфичность эпитопа для данных антител (например, посредством исследования связывания с сериями перекрывающихся пептидов, охватывающих тау). Затем фрагмент тау, состоящий из эпитопа, или содержащий эпитоп, или перекрывающийся с эпитопом, можно применять в качестве иммуногена. Такие фрагменты, как правило, применяют в нефосфорилированной форме.

[0439] Гетерологичный носитель и адъювант в случае использования могут являться такими же, которые применяли для получения моноклонального антитела, но могут также быть выбранными для лучшей фармацевтической пригодности с целью применения у человека. Подходящие носители включают сывороточные альбумины, гемоцианин фисуреллы, молекулы иммуноглобулина, тироглобулин, овальбумин, столбнячный анатоксин или анатоксин другой патогенной бактерии, такой как дифтерийный анатоксин (например, CRM197), анатоксин *E. coli*, холерный или *H. pylori*, или аттенуированное производное токсина. Т-клеточные эпитопы также являются подходящими молекулами-носителями. Некоторые конъюгаты могут быть образованы посредством связывания средств согласно настоящему изобретению с иммуностимулирующей полимерной молекулой (например, трипальмитоил-S-глицерин цистеином (Pam₃Cys), маннаном (полимером маннозы) или глюканом (β 1→2 полимер)), цитокинами (например, ИЛ-1, альфа- и β -пептидами ИЛ-1, ИЛ-2, γ -ИФН, ИЛ-10, ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором)) и хемокинами (например, MIP1- α и β , и RANTES). Иммуногены могут быть соединены с носителями посредством спейсерных аминокислот (например, gly-gly) или без них. Дополнительные носители включают вирусоподобные частицы. Вирусоподобные частицы (ВПЧ), также называемые псевдовирioнами или полученными из вирусов частицами, представляют собой

субъединичные структуры, состоящие из множества копий вирусного капсида и/или белка оболочки, способного к самосборке *in vivo* в ВПЧ определенной сферической симметрии. (Powilleit, et al., (2007) PLoS ONE 2(5):e415.) В качестве альтернативы, пептидные иммуногены можно присоединить к по меньшей мере одному искусственному Т-клеточному эпитопу, способному к связыванию с большей частью молекул МНС Класса II, такому как универсальный DR-эпитоп («PADRE»). PADRE описан в публикациях US 5,736,142, WO 95/07707 и Alexander J et al, Immunity, 1:751-761 (1994). Активные иммуногены могут быть представлены в мультимерной форме, в которой множество копий иммуногена и/или его носителя представлены в виде одной ковалентной молекулы.

10 **[0440]** Фрагменты часто вводят с фармацевтически приемлемыми адъювантами. Адъювант повышает титр индуцированных антител и/или аффинность связывания индуцированных антител по сравнению с ситуацией, когда пептид применяют сам по себе. Множество адъювантов можно применять в комбинации с иммуногенным фрагментом тау для вызова иммунного ответа. Предпочтительные адъюванты
15 увеличивают внутренний ответ на иммуноген, не вызывая конформационных изменений в иммуногене, влияющих на качественную форму ответа. Предпочтительные адъюванты включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия, 3 De-O-ацилированный монофосфорил-липид А (MPLTM) (см. GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Гамильтон, Монтана, сейчас часть Corixa). StimulonTM QS-21 представляет
20 собой тритерпеновый гликозид или сапонин, выделенный из коры дерева Quillaja Saponaria Molina, растущего в Южной Америке (см. публикацию Kensil *et al.*, in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5,057,540), (Aquila BioPharmaceuticals, Фраминген, Массачусетс; сейчас Antigenics, Inc., Нью-Йорк, Нью-Йорк). Другие адъюванты представляют собой эмульсии
25 «масло в воде» (такие как сквален или арахисовое масло), необязательно в комбинации с иммуностимулирующими средствами, такими как монофосфорил-липид А (см. публикацию Stoute *et al.*, N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)), плурониковые полимеры и убитые микобактерии. Адъюванты Ribi представляют собой эмульсии «масло в воде». Ribi содержит метаболизируемое масло (сквален), эмульгированное с солевым раствором, содержащим Tween 80. Ribi также содержит очищенные микобактериальные продукты,
30 которые действуют в качестве иммуностимулирующих средств, и бактериальный монофосфорил-липид А. Другим адъювантом является CpG (WO 98/40100). Адъюванты можно вводить в виде компонентов терапевтической композиции совместно с активным средством или можно вводить отдельно перед, во время или после введения
35 терапевтического средства.

[0441] Также можно применять аналоги природных фрагментов тау, которые индуцируют антитела против тау. Например, в таких пептидах одну или несколько либо все L-аминокислоты можно заменить D-аминокислотами. Также можно изменить порядок аминокислот на противоположное направление (ретро-пептид). Необязательно, пептид
5 содержит все D-аминокислоты в обратном порядке (ретро-инверсированный пептид). Пептиды и другие соединения, которые необязательно характеризуются значительным подобием аминокислотной последовательности с пептидами тау, но, несмотря на это, выступают в качестве миметиков пептидов тау и индуцируют аналогичный иммунный ответ. Также можно применять антиидиотипические антитела против моноклональных
10 антител против тау, как описано выше. Такие анти-Id антитела имитируют антиген и вызывают образование иммунного ответа против него (см. публикацию Essential Immunology, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., p. 181).

[0442] Пептиды (и, необязательно, носитель, слитый с пептидом) также можно вводить в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, и экспрессировать в пациенте *in situ*.
15 Сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген, как правило, присоединен к регуляторным элементам, таким как промотор и энхансер, которые обеспечивают экспрессию сегмента ДНК в предназначенных клетках-мишенях пациента. Для экспрессии в клетках крови, что является желательным для индукции иммунного ответа, элементы промотора и энхансера из генов легкой или тяжелой цепей иммуноглобулина или
20 основного немедленно-раннего промотора и энхансера ЦМВ (цитомегаловируса) являются подходящими для прямой экспрессии. Связанные регуляторные элементы и кодирующие последовательности часто клонируют в векторе. Антитела также можно вводить в форме нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую и/или легкую цепи антитела. Если присутствуют как тяжелая, так и легкая цепи, цепи предпочтительно соединяют в
25 виде одноцепочечного антитела. Антитела для пассивного введения можно также получить, например, посредством аффинной хроматографии из сыворотки пациентов, которые получали пептидные иммуногены.

[0443] ДНК можно доставить в «оголенной» форме (т.е. без коллоидных или инкапсулирующих материалов). В качестве альтернативы, можно применять несколько
30 систем вирусных векторов, включая ретровирусные системы (см., например, публикацию Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)); аденовирусные векторы (см., например, публикацию Bett et al, J. Virol. 67, 591-1 (1993)); аденоассоциированные вирусные векторы (см., например, публикацию Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)), вирусные векторы из семейства покс, включая вирус осповакцины и поксвирусы птиц,
35 вирусные векторы из рода альфа-вирусов, такие как таковые, полученные из вирусов

Синдбис и вируса леса Семлики (см., например, публикацию Dubensky et al., J. Virol. 70, 508-519 (1996)), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (см. US 5,643,576) и рабдовирусы, такие как вирус везикулярного стоматита (см. WO 96/34625) и папилломавирусы (Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo et al, WO 94/12629 и Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)).

[0444] ДНК, кодирующую иммуноген, или вектор, содержащий ДНК, можно упаковать в липосомы. Подходящие липиды и родственные аналоги описаны в публикациях US 5,208,036, US 5,264,618, US 5,279,833 и US 5,283,185. Векторы и ДНК, кодирующую иммуноген, можно также нанести на носители в форме частиц или связать с такими носителями, примеры которых включают полимеры на основе полиметилметакрилата и полилактиды, а также поли(лактид-ко-гликолиды) (см., например, публикацию McGee et al., J. Micro Encap. 1996).

Н. Скрининговые анализы антител

[0445] Можно первоначально провести скрининг антител в отношении предназначенной специфичности связывания, как описано выше. Аналогичным способом можно провести скрининг активных иммуногенов в отношении способности индуцировать антитела с такой специфичностью связывания. В данном случае активный иммуноген применяют для иммунизации лабораторного животного, и полученную в результате сыворотку исследуют в отношении соответствующей специфичности связывания.

[0446] Затем антитела, которые характеризуются желаемой специфичностью связывания, можно исследовать на клеточных моделях и моделях на животных. Клетки, которые применяют для такого скрининга, предпочтительно, представляют собой нейронные клетки. Сообщалось о клеточной модели патологии тау, в которой клетки нейробластомы трансфицировали доменом четырех повторов тау, необязательно с мутацией, связанной с патологией тау (например, дельта K280, см. публикацию Khlistunova, Current Alzheimer Research 4, 544-546 (2007)). В другой модели тау индуцируют в линии клеток нейробластомы N2a посредством добавления доксициклина. Клеточные модели позволяют изучить токсичность тау в отношении клеток в растворимом или агрегированном состоянии, возникновение агрегатов тау после включения экспрессии гена тау, растворение агрегатов тау снова после выключения экспрессии гена и эффективность антител при ингибировании образования агрегатов тау или их дезагрегации.

[0447] Также можно проводить скрининг антител или активных иммуногенов на моделях заболеваний, связанных с тау, на трансгенных животных. Такие трансгенные животные могут содержать трансген тау (например, любую из изоформ человека) и необязательно

трансген APP человека, среди прочих, такой как киназа, которая фосфорилирует тау, AроЕ, пресенилин или альфа-синуклеин. Такие трансгенные животные предрасположены к развитию по меньшей мере одного признака или симптома заболевания, связанного с тау.

- 5 **[0448]** Иллюстративное трансгенное животное представляет собой линию мышей K3 (Itner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(41):15997-6002 (2008)). Данные мыши содержат трансген тау человека с мутацией K 369 I (мутация связана с болезнью Пика) и промотор Thy 1.2. Данная модель демонстрирует быстрое течение нейродегенерации, двигательный дефект и дегенерацию афферентных волокон и гранулярных клеток мозжечка. Другое
- 10 иллюстративное животное представляет собой линию мышей JNPL3. Данные мыши содержат трансген тау человека с мутацией P301L (мутация связана с лобно-височной деменцией) и промотор Thy 1.2 (Taconic, Germantown, N.Y., Lewis, et al., Nat Genet. 25:402-405 (2000)). Данные мыши характеризуются более ступенчатым течением нейродегенерации. У мышей развиваются нейрофибриллярные клубки в нескольких
- 15 областях головного мозга и спинного мозга, публикация полностью включена посредством ссылки. Данная модель представляет собой превосходную модель для исследования последствий развития клубков и для скрининговой терапии, которая может ингибировать образование данных агрегатов. Другим преимуществом данных животных является относительно ранняя манифестация патологии. В гомозиготной линии можно
- 20 наблюдать поведенческие аномалии, связанные с патологией тау, по меньшей мере уже в 3 месяца, но животные остаются относительно здоровыми по меньшей мере до возраста 8 месяцев. Другими словами, в 8 месяцев животные передвигаются, питаются и могут выполнять поведенческие задания достаточно хорошо для обеспечения мониторинга эффектов лечения. Активная иммунизация данных мышей в течение 6 – 13 месяцев с
- 25 помощью AI wI KLN-PHF-1 позволяла получить титры приблизительно 1000 и продемонстрировала более редкие нейрофибриллярные клубки, меньше pSer422 и уменьшенное снижение веса по сравнению с контрольными мышами, которые не получали лечение.

- [0449]** Активность антител или активных средств можно оценить посредством различных
- 30 критериев, включая снижение количества суммарного тау или фосфорилированного тау, снижение других патологических характеристик, таких как отложения амилоида Aβ, и ингибирование или отсрочивание поведенческого дефицита. Активные иммуногены также можно исследовать в отношении индукции антител в сыворотке. Как пассивные, так и активные иммуногены можно исследовать в отношении прохождения антител через
- 35 гематоэнцефалический барьер в головной мозг трансгенного животного. Антитела или

фрагменты, индуцирующие антитело, можно также исследовать на приматах, отличных от человека, у которых природным путем или в результате индукции развиваются симптомы заболеваний, которые характеризуются тау. Исследования в отношении антитела или активного агента обычно проводят в сочетании с контролем, в котором проводят параллельный эксперимент, за исключением того, что антитело или активный агент отсутствует (например, заменены наполнителем). Затем снижение, отсрочивание или ингибирование признаков или симптомов заболевания, вызываемое антителом или активным агентом, исследование которого проводят, можно оценить по сравнению с контролем.

V. Пациенты, поддающиеся лечению

[0450] Присутствие нейрофибриллярных клубков было обнаружено при нескольких заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичную возрастную таупатию, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическую деменцию или деменцию боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа C, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь аргирофильных зерен, глобулярную глиальную таупатию, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальную дегенерацию (КБД), деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) и прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). Режимы согласно настоящему изобретению можно также применять при лечении или профилактике любого из данных заболеваний. По причине широко распространенной ассоциации между неврологическими заболеваниями и состояниями и тау режимы согласно настоящему изобретению можно применять при лечении или профилактике у любого субъекта, у которого наблюдаются повышенные уровни тау или фосфорилированного тау (например, в СМЖ), по сравнению со средним значением у индивидуумов без неврологических заболеваний. Режимы согласно настоящему изобретению можно также применять при лечении или профилактике неврологического заболевания у индивидуумов, содержащих мутацию в тау, связанную с неврологическим заболеванием. Способы согласно настоящему изобретению являются в особенности подходящими для лечения или профилактики болезни Альцгеймера, и особенно у пациентов.

[0451] Пациенты, поддающиеся лечению, включают индивидуумов, подверженных риску развития заболевания, но у которых не наблюдаются симптомы, а также пациентов, у которых на сегодняшний день наблюдаются симптомы. Пациенты, подверженные риску развития заболевания, включают таковых, которые подвержены известному

генетическому риску развития заболевания. Такие индивидуумы включают таковых, родственники которых страдали от данного заболевания, и таковых, риск которых был определен в результате анализа генетических или биохимических маркеров. Генетические маркеры риска включают мутации в тау, такие как мутации, обсуждавшиеся выше, а также мутации в других генах, связанные с неврологическим заболеванием. Например, аллель ApoE4 в гетерозиготной, а еще более в гомозиготной форме связана с риском развития болезни Альцгеймера. Другие маркеры риска болезни Альцгеймера включают мутации в гене APP, в частности, мутации в положении 717 и положениях 670 и 671, которые называют мутациями Hardy и Swedish, соответственно, мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, семейный анамнез БА (болезни Альцгеймера), гиперхолестеринемию или атеросклероз. Индивидуумов, которые на сегодняшний день страдают от болезни Альцгеймера, можно распознать посредством визуализации ПЭТ, на основании характерной деменции, а также присутствия факторов риска, описанных выше. Помимо этого, для идентификации индивидуумов, которые страдают от БА, доступно множество диагностических тестов. Данные тесты включают измерение уровней тау или фосфо-тау и Aβ42 в СМЖ. Повышенные уровни тау или фосфо-тау и сниженные уровни Aβ42 свидетельствуют о присутствии БА. Некоторые мутации связаны с болезнью Паркинсона. С болезнью Паркинсона связаны Ala30Pro или Ala53 либо мутации в других генах, таких как киназа с богатыми лейцином повторами, PARK8. Любое из неврологических заболеваний, упомянутых выше, можно также диагностировать у индивидуумов на основании критериев DSM IV TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition, text revision, Диагностическое и статистическое руководство по психическим расстройствам, четвертая редакция, пересмотренная).

[0452] У бессимптомных пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, 10, 20, 30). Однако обычно необязательно начинать лечение до тех пор, пока пациент не достигнет возраста 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение, как правило, предусматривает несколько доз в течение периода времени. Лечение можно контролировать посредством оценки уровней антитела в течение времени. Если ответ снижается, показана бустер-доза. В случае потенциальных пациентов с синдромом Дауна лечение можно начать до рождения посредством введения терапевтического средства матери или сразу после рождения.

I. Нуклеиновые кислоты

[0453] В настоящем изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любую из тяжелой и легкой цепей, описанных выше (например, SEQ ID NO: 7-8, 47-48, 49-50, 51-52, 53-54, 55, 59). Например, SEQ ID NO: 9 кодирует аминокислотную

последовательность вариабельной области тяжелой цепи 5G8 мыши SEQ ID NO:47, и SEQ ID NO:10 кодирует аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи 5G8 мыши SEQ ID NO:48. Необязательно, такие нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, и их можно экспрессировать с сигнальным пептидом, присоединенным к константной области. Кодирующие последовательности нуклеиновых кислот могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, таких как промотор, энхансер, сайт связывания рибосомы, сигнал терминации транскрипции и т.п. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи, могут существовать в выделенной форме либо их можно клонировать в одном или нескольких векторах. Нуклеиновые кислоты можно синтезировать посредством, например, твердофазного синтеза или ПЦР с перекрывающимися олигонуклеотидами. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи, можно соединить в виде одной непрерывной нуклеиновой кислоты, например, в векторе экспрессии, или такие нуклеиновые кислоты могут являться отдельными, например, каждую из них клонируют в свой собственный вектор экспрессии.

J. Конъюгированные антитела

[0454] Конъюгированные антитела, которые специфично связываются с антигенами, такими как тау, являются подходящими для определения присутствия тау; контроля и оценки эффективности терапевтических средств, применяемых для лечения пациентов, у которых была диагностирована болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП); для ингибирования или снижения агрегации тау; ингибирования или снижения образования волокон тау; снижения или устранения отложений тау; стабилизации нетоксичных конформаций тау; или лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных

зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП) у пациента. Например, такие антитела
5 можно конъюгировать с другими терапевтическими агентами, другими белками, другими антителами и/или обнаруживаемыми метками. См. публикации WO 03/057838; US 8,455,622. Такие терапевтические агенты могут представлять собой любое средство, которое можно применять для лечения, борьбы, облегчения, предотвращения или улучшения нежелательного состояния или заболевания у пациента, такого как болезнь
10 Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс
15 паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

[0455] Конъюгированные терапевтические агенты могут включать цитотоксические средства, цитостатические средства, нейротрофические средства, нейропротекторные
20 средства, радиотерапевтические средства, иммуномодулирующие средства или любые биологически активные средства, которые облегчают или усиливают активность антитела. Цитотоксическое средство может представлять собой любое средство, которое является токсичным в отношении клетки. Цитостатическое средство может представлять собой любое средство, которое ингибирует пролиферацию клеток. Нейротрофическое средство
25 может представлять собой любое средство, включая химические или белковые средства, которое стимулирует сохранение, рост или дифференциацию нейронов. Нейропротекторное средство может представлять собой средство, включая химические или белковые средства, которое защищает нейроны от острого инсульта или дегенеративных процессов. Иммуномодулятор может представлять собой любое средство,
30 которое стимулирует или ингибирует развитие или поддержание иммунологического ответа. Радиотерапевтическое средство может представлять собой любую молекулу или соединение, которое испускает излучение. Если такие терапевтические агенты соединены со специфичным антителом против тау, таким как антитела, описанные в настоящем документе, присоединенные терапевтические агенты будут обладать специфичной
35 аффинностью в отношении клеток, пораженных связанным с тау заболеванием, по

сравнению с нормальными клетками. Как следствие, введение конъюгированных антител непосредственно нацеливается на клетки рака с минимальным повреждением окружающей нормальной здоровой ткани. Данный подход может быть в особенности подходящим для терапевтических агентов, которые являются слишком токсичными, чтобы их можно было вводить сами по себе. Помимо этого, можно применять более низкие количества терапевтических агентов.

[0456] Некоторые такие антитела можно модифицировать, чтобы они действовали в качестве иммунотоксинов. См., например, патент США № 5,194,594. Например, рицин, клеточный токсин, полученный из растений, можно объединить с антителами с применением бифункциональных реактивов S-ацетилмеркаптоянтарного ангидрида для антитела и сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионата для рицина. См. публикацию Pietersz *et al.*, *Cancer Res.* 48(16):4469-4476 (1998). Объединение приводит к утрате связывающей активности В-цепи рицина, при этом не нарушая ни токсичный потенциал А-цепи рицина, ни активность антитела. Аналогично, сапорин, ингибитор сборки рибосом, можно присоединить к антителам посредством дисульфидной связи между введенными химическим способом сульфгидрильными группами. См. публикацию Polito *et al.*, *Leukemia* 18:1215-1222 (2004).

[0457] Некоторые такие антитела можно присоединить к радиоактивным изотопам. Примеры радиоактивных изотопов включают, например, иттрий⁹⁰ (⁹⁰Y), индий¹¹¹ (¹¹¹In), ¹³¹I, ^{99m}Tc, радиоактивное серебро-111, радиоактивное серебро-199 и висмут²¹³. Присоединение радиоактивных изотопов к антителам можно осуществить посредством общепринятых бифункциональных хелатов. Для присоединения радиоактивного серебра-111 и радиоактивного серебра-199 можно применять линкеры на основе серы. См. публикацию Hazra *et al.*, *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Присоединение радиоактивных изотопов серебра может включать восстановление иммуноглобулина аскорбиновой кислотой. Для радиоактивных изотопов, таких как ¹¹¹In и ⁹⁰Y, можно применять ибритутумаб тиуксетан, который будет вступать в реакцию с такими изотопами с образованием ¹¹¹In-ибритутумаба тиуксетана и ⁹⁰Y-ибритутумаба тиуксетана, соответственно. См. публикацию Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

[0458] Некоторые такие антитела можно присоединить к другим терапевтическим агентам. Такие терапевтические агенты могут являться, например, цитотоксическими, цитостатическими, нейротрофическими или нейропротекторными. Например, антитела можно конъюгировать с токсичными химиотерапевтическими лекарственными средствами, такими как майтансин, гелданамицин, ингибиторы тубулина, такие как

средства, связывающие тубулин (например, ауристатин), или средства, связывающиеся с малой бороздой, такие как калихеамицин. Другие типичные терапевтические агенты включают средства, которые, как известно, являются подходящими для лечения, ведения или облегчения болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП).

[0459] Антитела также можно объединить с другими белками. Например, антитела можно объединить с финомерами. Финомеры представляют собой небольшие связывающиеся белки (например, размером 7 кДа), полученные из домена Fyn SH3 человека. Финомеры могут являться стабильными и растворимыми, и в них могут отсутствовать остатки цистеина и дисульфидные связи. Финомеры могут быть сконструированы так, чтобы связываться с молекулами-мишенями с той же аффинностью и специфичностью, что и антитела. Они являются подходящими для создания мультиспецифичных слитых белков на основе антител. Например, финомеры могут являться слитыми с N-терминальным и/или C-терминальным концами антител для создания би- и триспецифичных FynomAb с различной архитектурой. Финомеры можно выбрать с применением библиотек финомеров посредством методик скрининга с применением FACS, Biacore и анализов на клетках, которые позволяют провести эффективный отбор финомеров с оптимальными свойствами. Примеры финомеров раскрыты в публикациях Grabulovski et al., J. Biol. Chem. 282:3196-3204 (2007); Bertschinger et al., Protein Eng. Des. Sel. 20:57-68 (2007); Schlatter et al., MAbs. 4:497-508 (2011); Banner et al., Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 69(Pt6):1124-1137 (2013); и Brack et al., Mol. Cancer Ther. 13:2030-2039 (2014).

[0460] Антитела, раскрытые в настоящем документе, можно также объединить или конъюгировать с одним или несколькими другими антителами (например, с образованием гетероконъюгатов антител). Такие другие антитела могут связываться с отличными эпитопами в пределах тау или могут связываться с отличным антигеном-мишенью.

[0461] Антитела можно также объединить с обнаруживаемой меткой. Такие антитела можно применять, например, для диагностики болезни Альцгеймера, синдрома Дауна,

легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), и/или для оценки эффективности лечения. Такие антитела являются в особенности подходящими для осуществления такого

определения у субъектов, которые страдают от или предрасположены к болезни Альцгеймера, синдрому Дауна, легким когнитивным нарушениям, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитическому паркинсонизму, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерному параличу, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофическому латеральному склерозу/комплексу паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианту болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующему надъядерному параличу (ПНП), или в соответствующих биологических образцах, полученных от таких субъектов. Типичные обнаруживаемые

метки, которые можно объединить с антителом или присоединить к антителу, включают различные ферменты, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как люминол; биолюминесцентные материалы, такие как люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, такие как радиоактивное серебро-111, радиоактивное серебро-199, висмут²¹³, иод (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), технеций (⁹⁹Tc), таллий (²⁰¹Tl), галлий (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), палладий (¹⁰³Pd), молибден (⁹⁹Mo), ксенон (¹³³Xe), фтор (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn и ¹¹⁷Tm; позитронно-активные металлы с применением различных вариантов позитронно-эмиссионной томографии; нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов; и молекулы, которые являются радиоактивно мечеными или конъюгированными со специфичными радиоактивными изотопами.

[0462] Присоединение радиоактивных изотопов к антителам можно осуществить посредством общепринятых бифункциональных хелатов. Для присоединения радиоактивного серебра-111 и радиоактивного серебра-199 можно применять линкеры на основе серы. См. публикацию Hazga *et al.*, *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Присоединение радиоактивных изотопов серебра может включать восстановление иммуноглобулина аскорбиновой кислотой. Для радиоактивных изотопов, таких как ¹¹¹In и ⁹⁰Y, можно применять ибритутумаб тиуксетан, который будет вступать в реакцию с такими изотопами с образованием ¹¹¹In-ибритутумаба тиуксетана и ⁹⁰Y-ибритутумаба тиуксетана, соответственно. См. публикацию Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

[0463] Терапевтические агенты, другие белки, другие антитела и/или обнаруживаемые метки могут быть объединены или конъюгированы напрямую или опосредованно с применением посредника (например, линкера) с антителом согласно настоящему изобретению. См., например, публикации Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985); и Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Подходящие линкеры включают, например, отщепляемые и неотщепляемые линкеры. Можно применять различные линкеры, которые высвобождают присоединенные терапевтические агенты, белки, антитела и/или обнаруживаемые метки в кислых или восстанавливающих условиях, при воздействии специфичных протеаз или при других определенных условиях.

VI. Фармацевтические композиции и способы применения

[0464] При профилактических вариантах применения антитело или средство для индукции антитела или фармацевтическую композицию, содержащую указанные антитело или средство, вводят пациенту, предрасположенному или иным способом подверженному риску развития заболевания (например, болезни Альцгеймера), в режиме (дозе, частоте и пути введения), эффективном для снижения риска, уменьшения тяжести или отсрочивания манифестации по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В частности, режим, предпочтительно, является эффективным для ингибирования или отсрочивания

тау или фосфо-тау и спаренных волокон, образованных из них, в головном мозге, и/или ингибирования или отсрочивания их токсичных эффектов, и/или ингибирования/или отсрочивания развития поведенческого дефицита. При терапевтических вариантах применения антитело или средство для индукции антитела вводят пациенту, 5 предрасположенному к заболеванию или уже страдающему от заболевания (например, болезни Альцгеймера), в режиме (дозе, частоте и пути введения), эффективном для облегчения или по меньшей мере ингибирования дальнейшего ухудшения по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В частности, режим, предпочтительно, является эффективным для снижения или по меньшей мере ингибирования дальнейшего 10 повышения уровней тау, фосфо-тау или спаренных волокон, образованных из них, связанной токсичности и/или поведенческого дефицита.

[0465] Режим считают терапевтически или профилактически эффективным, если индивидуальный пациент, получающий лечение, достигает более благоприятного исхода, чем средний исход в контрольной популяции сравнимых пациентов, которые не получали 15 лечение способами согласно настоящему изобретению, или если у получавших лечение пациентов наблюдается более благоприятный исход по сравнению с контрольными пациентами в контролируемом клиническом исследовании (например, исследовании фазы II, фазы II/III или фазы III) при уровне $p < 0,05$ или $0,01$, или даже $0,001$.

[0466] Эффективные дозы варьируют в зависимости от множества различных факторов, 20 таких как способы введения, сайт-мишень, физиологическое состояние пациента, представляет ли собой пациент носителя АроЕ, представляет ли собой пациент человека или животное, другие вводимые лекарственные средства, является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

[0467] Иллюстративные диапазоны доз для антител составляют от приблизительно $0,01$ до 25 60 мг/кг, или от приблизительно $0,1$ до 3 мг/кг, или $0,15 - 2$ мг/кг, или $0,15 - 1,5$ мг/кг массы тела пациента. Антитело можно вводить в таких дозах ежедневно, через день, еженедельно, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в три месяца или согласно любому другому расписанию, определенному посредством эмпирического анализа. Иллюстративное лечение предусматривает введение в нескольких дозах в течение 30 длительного периода времени, например, по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные иллюстративные режимы лечения предусматривают введение один раз в две недели, или один раз в месяц, или один раз в $3 - 6$ месяцев.

[0468] Количество средства для активного введения варьирует от $0,1 - 500$ мкг на 35 пациента и, более часто, от $1 - 100$ или $1 - 10$ мкг на инъекцию для введения человеку.

Время между введением инъекций может варьировать в значительной степени от одного

раза в день до одного раза в год, до одного раза в десять лет. Типичный режим состоит из иммунизации с последующими бустер-инъекциями через интервалы времени, такие как интервалы 6 недель или два месяца. Другой режим состоит из иммунизации с последующими бустер-инъекциями через 1, 2 и 12 месяцев. Другой режим

5 предусматривает инъекцию один раз в два месяца в течение жизни. В качестве альтернативы, бустер-инъекции можно вводить нерегулярно, как показано на основании мониторинга иммунного ответа.

[0469] Антитела или средства для индукции антител, предпочтительно, вводят периферическим путем (т.е. единица, в которой вводят или которая индуцирует антитело, пересекает гематоэнцефалический барьер для достижения предназначенного участка в

10 головном мозге). Пути введения включают местный, внутривенный, пероральный, подкожный, внутриартериальный, внутричерепной, интратекальный, интраперитонеальный, интраназальный, внутриглазной или внутримышечный. Предпочтительными путями введения антител являются внутривенный и подкожный.

15 Предпочтительными путями для активной иммунизации являются подкожный и внутримышечный. Данный тип инъекции наиболее часто осуществляют в мышцы плеча или ноги. В некоторых способах средства инъектируют непосредственно в конкретную ткань, в которой накопились отложения, например, посредством внутричерепной инъекции.

[0470] Фармацевтические композиции для парентерального введения, предпочтительно, являются стерильными и по существу изотоническими, и их производят в условиях GMP (Good manufacturing practices, надлежащей производственной практики). Фармацевтические композиции могут быть предложены в единичной дозированной форме (т.е. дозе для однократного введения). Фармацевтические композиции можно приготовить

25 в состав с применением одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ или вспомогательных средств. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекции антитела можно приготовить в состав в водных растворах, предпочтительно, в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой раствор или ацетатный буфер (для

30 снижения неприятных ощущений в участке инъекции). Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. В качестве альтернативы, антитела могут находиться в лиофилизированной форме для восстановления перед применением подходящим наполнителем, например, стерильной апиrogenной водой.

[0471] Режимы согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с другим средством, эффективным при лечении или профилактике заболевания, лечение которого проводят. Например, в случае болезни Альцгеймера режимы согласно настоящему изобретению можно сочетать с иммунотерапией против Аβ (WO/2000/072880),
5 ингибиторами холинэстеразы или мемантином, или в случае болезни Паркинсона – с иммунотерапией против альфа-синуклеина WO/2008/103472, леводопой, агонистами дофамина, ингибиторами COMT, ингибиторами MAO-B, амантадином или антихолинэргическими средствами.

[0472] Антитела вводят в эффективном режиме, что означает дозу, путь введения и
10 частоту введения, которые отсрочивают манифестацию, уменьшают тяжесть, ингибируют дальнейшее ухудшение и/или облегчают по меньшей мере один признак или симптом нарушения, лечение которого проводят. Если пациент уже страдает от нарушения, режим могут называть терапевтически эффективным режимом. Если пациент подвержен повышенному риску развития нарушения по сравнению с общей популяцией, но пока не
15 испытывает симптомов, режим могут называть профилактически эффективным режимом. В некоторых случаях терапевтическую или профилактическую эффективность можно продемонстрировать у индивидуального пациента по сравнению с историческими контролями или прошлым опытом того же пациента. В других случаях терапевтическую или профилактическую эффективность можно продемонстрировать в доклиническом или
20 клиническом исследовании на популяции получающих лечение пациентов по сравнению с контрольной популяцией не получающих лечение пациентов

[0473] Иллюстративные дозы антитела составляют 0,1 – 60 мг/кг (например, 0,5, 3, 10, 30 или 60 мг/кг), или 0,5 – 5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5 мг/кг), или 10 – 4000 мг либо 10 – 1500 мг в виде фиксированной дозы. Доза зависит от состояния
25 пациента и ответа на предшествующее лечение, в случае его наличия, от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим, и от того, является ли нарушение острым или хроническим, помимо других факторов.

[0474] Введение может являться парентеральным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутрочерепным, интратекальным,
30 интраперитонеальным, местным, интраназальным или внутримышечным. Некоторые антитела можно вводить в системное кровообращение посредством внутривенного или подкожного введения. Внутривенное введение можно осуществлять, например, посредством инфузии в течение периода времени, такого как 30 – 90 мин.

[0475] Частота введения зависит от периода полужизни антитела в сосудистом русле,
35 состояния пациента и пути введения, помимо других факторов. Частота может

представлять собой введение ежедневно, еженедельно, один раз в месяц, один раз в три месяца или введение с нерегулярными интервалами в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирование нарушения, лечение которого проводят. Иллюстративная частота для внутривенного введения составляет от введения еженедельно до одного раза в три месяца в течение непрерывного курса лечения, несмотря на то, что также возможно более или менее частое введение доз. Для подкожного введения иллюстративная частота введения доз составляет от введения ежедневно до одного раза в месяц, несмотря на то, что также возможно более или менее частое введение доз.

[0476] Количество вводимых доз зависит от того, является ли нарушение острым или хроническим, и от ответа нарушения на лечение. В случае острых нарушений или острых обострений хронического нарушения часто достаточными являются от 1 до 10 доз. Иногда одна болюсная доза, необязательно разделенная, является достаточной в случае острого нарушения или острого обострения хронического нарушения. Лечение можно повторять в случае повторного появления острого нарушения или острого обострения. В случае хронических нарушений антитело можно вводить с регулярными интервалами, например, еженедельно, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в три месяца, один раз в шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет, или в течение жизни пациента.

A. Способы диагностики и мониторинга

Способы визуализации, диагностики *in vivo* и оптимизации иммунотерапии

[0477] В настоящем изобретении предложены способы визуализации отложенных тау-белка (например, нейрофибриллярных клубков и включений тау) у пациента *in vivo*. Способы осуществляют посредством введения реактива, такого как антитело, которое связывается с тау (например, антитело 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6 мыши, гуманизированное, химерное или венированное антитело 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6), пациенту, а затем посредством обнаружения средства после его связывания. Клирингового ответа на введенные антитела можно избежать или его можно снизить с применением фрагментов антитела, в которых отсутствует полноразмерная константная область, таких как Fab. В некоторых способах одно и то же антитело может выступать в качестве реактива как для лечения, так и для диагностики.

[0478] Диагностические реактивы можно вводить посредством внутривенной инъекции в организм пациента либо непосредственно в головной мозг с помощью внутримозговой инъекции или посредством сверления отверстия в черепе. Доза реактива должна находиться в тех же диапазонах, как и для способов лечения. Как правило, реактив является меченым, несмотря на то, что в некоторых способах первичный реактив с аффинностью в отношении тау является немеченым, и для связывания с первичным

реактивом применяют вторичное средство мечения. Выбор метки зависит от способов обнаружения. Например, флуоресцентная метка является подходящей для оптического обнаружения. Применение парамагнитных меток является подходящим для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки можно также обнаружить с применением позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

[0479] Способы визуализации отложений тау-белка *in vivo* являются подходящими для диагностики или подтверждения диагноза таупатии, такой как болезнь Альцгеймера, лобно-височная лобарная дегенерация, прогрессирующий надъядерный паралич и болезнь Пика, или предрасположенности к такому заболеванию. Например, способы можно применять в отношении пациента, у которого наблюдаются симптомы деменции. Если у пациента присутствуют аномальные нейрофибриллярные клубки, тогда пациент, вероятно, страдает от болезни Альцгеймера. В качестве альтернативы, если у пациента присутствуют аномальные включения тау, тогда, в зависимости от расположения включений, пациент может страдать от лобно-височной лобарной дегенерации. Способы можно также применять в отношении бессимптомных пациентов. Присутствие отложений аномального тау-белка свидетельствует о предрасположенности к последующему симптоматическому заболеванию. Способы также являются подходящими для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение у пациентов, у которых ранее было диагностировано связанное с тау заболевание.

[0480] Диагностику можно осуществлять посредством сравнения количества, размера и/или интенсивности меченого локуса с соответствующими исходными значениями. Исходные значения могут представлять собой средние уровни в популяции не страдающих от заболевания индивидуумов. Исходные значения могут также представлять собой предшествующие уровни, определенные у того же пациента. Например, исходные значения можно определить у пациента до начала лечения иммунотерапией тау, а после этого измеренные значения сравнить с исходными значениями. Снижение значений по сравнению с исходным уровнем свидетельствует о положительном ответе на лечение.

[0481] У некоторых пациентов диагностику таупатии можно облегчить посредством осуществления сканирования ПЭТ. Сканирование ПЭТ можно осуществить с применением, например, общепринятого аппарата для визуализации ПЭТ и вспомогательного оборудования. Сканирование, как правило, охватывает одну или несколько областей головного мозга, которые, как известно, обычно связаны с отложениями тау-белка, и одну или несколько областей, в которых, как правило,

присутствует небольшое количество, в случае наличия, отложений, и которые выступают в качестве контролей.

[0482] Сигнал, обнаруженный при сканировании ПЭТ, можно представить в виде многомерного изображения. Многомерное изображение может быть представлено в двух измерениях, представляющих собой поперечное сечение головного мозга, в трех измерениях, представляющих собой трехмерный головной мозг, или в четырех измерениях, представляющих собой изменения в трехмерном головном мозге в течение времени. Можно применять колориметрическую шкалу с различными цветами, указывающими на различные количества метки, и логически выведенное обнаруженное отложение тау-белка. Результаты сканирования можно также представить в числовом выражении с цифрами, относящимися к обнаруженному количеству метки, и, как следствие, количеству отложений тау-белка. Метку, присутствующую в области головного мозга, которая, как известно, связана с отложениями в случае конкретной таупатии (например, болезни Альцгеймера), можно сравнить с меткой, присутствующей в области, которая, как известно, не связана с отложениями, для получения соотношения, свидетельствующего о степени отложений в первой области. Для одного и того же радиоактивно меченного лиганда такие соотношения обеспечивают сопоставимый показатель отложений тау-белка и его изменений между различными пациентами.

[0483] В некоторых способах сканирование ПЭТ проводят одновременно или в ходе того же визита пациента, что и сканирование МРТ (магнитно-резонансной томографии) или КТ (компьютерной томографии). Сканирование МРТ или КТ позволяет получить больше информации об анатомических деталях головного мозга, чем сканирование ПЭТ. Однако изображение от сканирования ПЭТ можно наложить на изображение от сканирования МРТ или КТ, чтобы более точно указать расположение лиганда ПЭТ и логически выведенных отложений тау по сравнению с анатомическими структурами в головном мозге. Некоторые приборы могут осуществлять как сканирование ПЭТ, так и сканирование МРТ или КТ без изменения положения пациента между сканированием, что облегчает наложение изображений.

[0484] Подходящие лиганды ПЭТ включают меченные радиоактивной меткой антитела согласно настоящему изобретению (например, антитело 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6 мыши, гуманизированное, химерное или венированное антитело 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6). Используемый радиоактивный изотоп может представлять собой, например, C^{11} , N^{13} , O^{15} , F^{18} или I^{123} . Интервал между введением лиганда ПЭТ и осуществлением сканирования может зависеть от лиганда ПЭТ и, в частности, его скорости поглощения и клиренса в головной мозг, а также периода полужизни его радиоактивной метки.

[0485] Сканирование ПЭТ можно также осуществлять в качестве профилактической меры у бессимптомных пациентов или пациентов, у которых наблюдаются симптомы легкого когнитивного нарушения, но которым еще не был поставлен диагноз таупатии, которые, однако, подвержены повышенному риску развития таупатии. В случае бессимптомных
5 пациентов сканирование является в особенности подходящим для индивидуумов, которые, как считают, подвержены повышенному риску развития таупатии в связи с семейным анамнезом, генетическими или биохимическими факторами риска или зрелым возрастом. К профилактическому сканированию можно приступать, например, у пациентов в возрасте от 45 до 75 лет. У некоторых пациентов первое сканирование
10 проводят в возрасте 50 лет.

[0486] Профилактическое сканирование можно осуществлять с интервалами, например, от шести месяцев до десяти лет, предпочтительно, 1 – 5 лет. У некоторых пациентов профилактическое сканирование проводят ежегодно. Если сканирование ПЭТ, проведенное в качестве профилактической меры, свидетельствует об аномально высоких
15 уровнях отложений тау-белка, можно начинать применение иммунотерапии и проводить последующие сканирования ПЭТ, как для пациентов, у которых была диагностирована таупатия. Если сканирование ПЭТ, проведенное в качестве профилактической меры, свидетельствует об уровнях отложений тау-белка в пределах нормы, можно проводить последующие сканирования ПЭТ с интервалами от шести месяцев до десяти лет,
20 предпочтительно, 1 – 5 лет, как и ранее, либо в ответ на появление признаков и симптомов таупатии или легкого когнитивного нарушения. Посредством сочетания профилактического сканирования с введением направленной на тау иммунотерапии, если и когда были обнаружены отложения тау-белка выше нормального уровня, уровни отложений тау-белка можно снизить до нормальных уровней или близко к ним, или по
25 меньшей мере ингибировать их повышение в дальнейшем, и пациент может оставаться свободным от таупатии в течение более длительного периода времени, чем в случае, если он не получает профилактическое сканирование и направленную на тау иммунотерапию (например, по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 лет, или в течение оставшейся жизни пациента).

[0487] Нормальные уровни отложений тау-белка можно определить на основании количества нейрофибриллярных клубков или включений тау в головном мозге репрезентативного образца от индивидуумов в общей популяции, у которых не была диагностирована конкретная таупатия (например, болезнь Альцгеймера) и которые, как
30 считают, не подвержены повышенному риску развития такого заболевания (например, репрезентативный образец не страдающих от заболевания индивидуумов в возрасте до 50

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

[0488] После начала иммунотерапии снижение уровня отложений тау-белка можно сначала наблюдать как свидетельство того, что лечение производит желаемый эффект.

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

[0489] Сохранение отложений тау-белка на приблизительно постоянном уровне или даже незначительное увеличение отложений тау-белка может также свидетельствовать об ответе на лечение, пусть даже и субоптимальном ответе. Такие ответы можно сравнить с временной динамикой уровней отложений тау-белка у пациентов с конкретной таупатией (например, болезнью Альцгеймера), которые не получают лечение, для определения того, производит ли иммунотерапия эффект в отношении ингибирования последующего повышения отложений тау-белка.

[0490] Мониторинг изменений отложений тау-белка позволяет откорректировать иммунотерапию или другой режим лечения в ответ на лечение. Мониторинг ПЭТ

обеспечивает указание на природу и степень ответа на лечение. Затем можно определить, нужно ли корректировать лечение, и в случае необходимости лечение можно откорректировать в ответ на мониторинг ПЭТ. Таким образом, мониторинг ПЭТ позволяет откорректировать направленную на тау иммунотерапию или другой режим

5 лечения до того, как другие биомаркеры, МРТ или когнитивные показатели продемонстрировали обнаруживаемые ответы. Значительное изменение означает, что сравнение значения параметра после лечения по сравнению с исходным уровнем обеспечивает некоторое доказательство, что лечение привело или не привело к благоприятному эффекту. В некоторых случаях изменение значений параметра у пациента

10 само по себе обеспечивает доказательство, что лечение привело или не привело к благоприятному эффекту. В других случаях изменение значений, в случае наличия, у пациента сравнивают с изменением значений, в случае наличия, в репрезентативной контрольной популяции пациентов, которые не получали иммунотерапию. Разница между ответом конкретного пациента и нормальным ответом контрольного пациента (например,

15 среднее значение плюс дисперсия стандартного отклонения) может также обеспечить доказательство, что режим иммунотерапии достиг благоприятного эффекта для пациента или не достиг его.

[0491] У некоторых пациентов мониторинг свидетельствует об обнаруживаемом снижении отложений тау-белка, но данный уровень отложений тау-белка остается выше

20 нормального. Для таких пациентов, если неприемлемые побочные эффекты отсутствуют, режим лечения можно продолжить без изменений или даже с увеличением частоты введения и/или дозы, если лечение уже не проводят при максимальной рекомендуемой дозе.

[0492] Если мониторинг свидетельствует об уровнях отложений тау-белка у пациента, которые уже были снижены до нормальных уровней или находятся вблизи от нормальных

25 уровней отложений тау-белка, режим иммунотерапии можно откорректировать с такового для индукции (т.е. который снижает уровень отложений тау-белка) к таковому для сохранения (т.е. который поддерживает отложения тау-белка на приблизительно постоянном уровне). На такой режим можно влиять посредством снижения дозы и/или

30 частоты введения иммунотерапии.

[0493] У других пациентов мониторинг может свидетельствовать, что иммунотерапия характеризуется некоторым благоприятным эффектом, но субоптимальным эффектом. Оптимальный эффект можно определить как процент снижения уровня отложений тау-белка в пределах верхней половины или квартиля изменения отложений тау-белка

35 (измеренного или рассчитанного для всего головного мозга или его репрезентативной

области или областей, в которых, как известно, образуются отложения тау-белка), наблюдаемого в репрезентативном образце от пациентов, страдающих от таупатии, которые получают иммунотерапию в данную временную точку после начала терапии. Пациента, который испытывает меньшее снижение, или пациента, отложения тау-белка у которого остаются постоянными или даже повышаются, но в меньшей степени, чем ожидается при отсутствии иммунотерапии (например, как измерено в контрольной группе пациентов, которым не вводят иммунотерапию), можно классифицировать как демонстрирующего положительный, но субоптимальный ответ. Таким пациентам можно необязательно откорректировать режим, при этом увеличивая дозу и/или частоту введения средства.

[0494] У некоторых пациентов отложения тау-белка могут повышаться в аналогичной или большей степени по сравнению с отложениями тау у пациентов, которые не получают иммунотерапию. Если такое повышение продолжается в течение периода времени, такого как 18 месяцев или 2 года, даже после любого повышения частоты или дозы средства, иммунотерапию можно при необходимости прекратить в пользу других вариантов лечения.

[0495] Вышеупомянутое описание диагностики, мониторинга и корректировки лечения таупатий, главным образом, сфокусировано на применении сканирования ПЭТ. Однако для осуществления таких способов можно применять любую другую методику для визуализации и/или измерения отложений тау-белка, подходящую для применения с антителами против тау согласно настоящему изобретению (например, антителом 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6 мыши или гуманизированным, химерным или венированным антителом 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6), вместо сканирования ПЭТ.

[0496] Также предложены способы обнаружения иммунного ответа против тау у пациента, страдающего от или предрасположенного к заболеваниям, связанным с тау. Способы можно применять для мониторинга течения терапевтического и профилактического лечения средствами, предложенными в настоящем документе. Профиль антитела после пассивной иммунизации, как правило, демонстрирует быстрый пик концентрации антитела с последующим экспоненциальным спадом. При отсутствии следующей дозы спад достигнет уровней до начала лечения в течение периода времени длительностью от дней до месяца в зависимости от периода полужизни вводимого антитела. Например, период полужизни некоторых антител человека составляет порядка 20 дней.

[0497] В некоторых способах измерение антитела против тау на исходном уровне у субъекта проводят до введения, второе измерение проводят вскоре после этого для

определения пикового уровня антитела, и одно или несколько последующих измерений проводят через интервалы времени для мониторинга снижения уровней антитела. Когда уровень антитела снизился до исходного уровня или заранее определенного процента пика менее исходного уровня (например, 50%, 25% или 10%), проводят введение

5 следующей дозы антитела. В некоторых способах пиковые или последующие измеренные уровни менее фонового уровня сравнивают с эталонными уровнями, ранее определенными, чтобы составить благоприятный режим профилактического или терапевтического лечения для других субъектов. Если измеренный уровень антитела является в значительной степени меньшим, чем эталонный уровень (например, меньшим,

10 чем среднее значение минус одно или, предпочтительно, два стандартных отклонения от эталонного значения в популяции субъектов, получающих пользу от лечения), показано введение дополнительной дозы антитела.

[0498] Также предложены способы обнаружения тау у субъекта, например, посредством измерения тау в образце от субъекта или посредством визуализации тау у субъекта *in vivo*.

15 Такие способы являются подходящими для диагностики или подтверждения диагноза заболеваний, связанных с тау, или предрасположенности к указанным заболеваниям. Способы можно также применять в отношении бессимптомных субъектов. Присутствие тау свидетельствует о предрасположенности к будущему симптоматическому заболеванию. Способы также являются подходящими для мониторинга прогрессирования

20 заболевания и/или ответа на лечение у субъектов, у которых ранее была диагностирована болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь

25 аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

[0499] Можно осуществить контакт биологических образцов, полученных от субъекта,

30 страдающего, как подозревают, страдающего, или подверженного риску развития болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни

35 аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального

склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), с антителами, раскрытыми в настоящем документе, для оценки присутствия тау. Например, уровни тау у таких субъектов можно сравнить с таковыми, присутствующими у здоровых субъектов. В качестве альтернативы, уровни тау у таких субъектов, которые получают лечение заболевания, можно сравнить с таковыми субъектов, которые не получали лечение болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП). Некоторые такие исследования включают биопсию ткани, полученной от таких субъектов. Анализы ELISA могут также являться подходящими способами, например, для оценки тау в жидких образцах.

VII. Наборы

[0500] В настоящем изобретении также предложены наборы (например, контейнеры), содержащие антитела, раскрытые в настоящем документе, и сопутствующие материалы, такие как инструкции по применению (например, листок-вкладыш). Инструкции по применению могут содержать, например, инструкции по введению антитела и необязательно одного или нескольких дополнительных средств. Контейнеры антител могут представлять собой дозы на один прием, упаковки большого объема (например, многодозовые упаковки), или дозы, меньшие, чем доза на один прием.

[0501] Листок-вкладыш означает инструкции, которые обычно вкладывают в коммерческие упаковки терапевтических продуктов и которые содержат информацию относительно показаний, применения, дозы, введения, противопоказаний и/или предостережений относительно применения таких терапевтических продуктов.

[0502] Наборы могут также содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (bacteriostatic water for injection, BWFI), фосфатно-буферный солевой раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Наборы могут также содержать другие материалы, желательные с

коммерческой точки зрения и точки зрения потребителя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

VIII. Другие варианты применения

[0503] Антитела можно применять для обнаружения тау или его фрагментов в контексте

5 клинической диагностики или лечения, или в исследованиях. Например, антитела можно применять для обнаружения присутствия тау в биологическом образце как свидетельства того, что биологический образец содержит отложения тау. Связывание антител с биологическим образцом можно сравнить со связыванием антител с контрольным образцом. Контрольный образец и биологический образец могут содержать клетки, 10 которые происходят из одной ткани. Контрольные образцы и биологические образцы можно получить от одного индивидуума или различных индивидуумов одновременно или в различные периоды времени. При необходимости, несколько биологических образцов и несколько контрольных образцов оценивают в различные периоды времени для защиты от случайной вариации вне зависимости от различий между образцами. Затем можно 15 провести прямое сравнение между биологическим образцом или образцами и контрольным образцом или образцами для определения того, увеличено, снижено или является аналогичным связывание антитела (т.е. присутствие тау) с биологическим образцом или образцами по сравнению со связыванием антитела с контрольным образцом или образцами. Увеличенное связывание антитела с биологическим образцом или 20 образцами по сравнению с контрольным образцом или образцами свидетельствует о присутствии тау в биологическом образце или образцах. В некоторых случаях увеличенное связывание антитела является статистически значимым. Необязательно, связывание антитела с биологическим образцом по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз или 100 раз выше, чем связывание антитела с контрольным 25 образцом.

[0504] Помимо этого, антитела можно применять для обнаружения присутствия тау в биологическом образце для мониторинга и оценки эффективности терапевтического средства, которое применяют для лечения пациента, у которого была диагностирована 30 болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), 35 деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или

прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). Биологический образец от пациента, у которого была диагностирована болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, 5 болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич 10 (ПНП), оценивают для установления исходного уровня связывания антител с образцом (т.е. исходного уровня присутствия тау в образце) до начала терапии терапевтическим средством. В некоторых случаях несколько биологических образцов от пациента оценивают в различные периоды времени для установления как исходного уровня, так и показателя случайной вариации, не зависящей от лечения. Затем терапевтическое 15 средство вводят в режиме. Режим может включать несколько введений средства в течение периода времени. Необязательно, связывание антител (т.е. присутствие тау) оценивают в различные периоды времени в нескольких биологических образцах от пациента как для установления показателя случайной вариации, так и для демонстрации тенденции ответа на иммунотерапию. Затем сравнивают различные оценки связывания антитела с 20 биологическими образцами. Если проводят только две оценки, можно провести прямое сравнение между двумя оценками для определения того, увеличено, снижено или остается аналогичным связывание антитела (т.е. присутствие тау) между двумя оценками. Если проводят более двух измерений, измерения можно проанализировать во временной динамике, начиная от момента до лечения терапевтическим средством и продолжая в 25 течение курса терапии. В случае пациентов, у которых снизилось связывание антитела с биологическими образцами (т.е. присутствие тау), будет сделано заключение, что терапевтическое средство было эффективным при лечении болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции 30 боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или 35 прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП) у пациента. Снижение связывания

антитела может являться статистически значимым. Необязательно, связывание снижается по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. Оценку связывания антитела можно проводить в сочетании с оценкой других признаков и симптомов болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа C, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция

5

10

Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП).

[0505] Антитела можно также применять в качестве исследовательских реактивов для лабораторного исследования при обнаружении тау или его фрагментов. В таких вариантах применения антитела можно пометить флуоресцентными молекулами, спин-меченными молекулами, ферментами или радиоактивными изотопами, и можно предложить в форме набора со всеми необходимыми реактивами для проведения анализа обнаружения. Антитела можно также применять для очистки тау или партнеров связывания тау, например, методом аффинной хроматографии.

20 **[0506]** Все патенты, веб-сайты, другие публикации, учетные номера и т.п., ссылки на которые содержатся выше или ниже, полностью включены посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждый из данных документов был конкретно и индивидуально указан как включенный посредством ссылки. Если различные версии последовательности связаны с учетным номером в разное время, то подразумевается

25

версия, связанная с учетным номером на действительную дату подачи данной заявки. Действительная дата подачи заявки означает более раннюю из действительной даты подачи или даты подачи приоритетной заявки, ссылающейся на учетный номер, если это применимо. Аналогично, если различные версии публикации, веб-сайта или т.п. опубликованы в разное время, то подразумевается версия, опубликованная самой

30

последней на действительную дату подачи заявки, если не указано обратное. Любой признак, стадия, элемент, вариант реализации или аспект настоящего изобретения можно применять в комбинации с любым другим, если специально не указано обратное. Несмотря на то, что настоящее изобретение описано достаточно подробно при помощи иллюстрации и примера с целью ясности и понимания, будет очевидно, что некоторые

изменения и модификации могут быть произведены в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Идентификация моноклональных антител против тау

5 **[0507]** Моноклональные антитела против тау получали следующим образом. Иммунизации проводили с применением либо рекомбинантного тау человека размером 383 а.к., аминокислот (4R0N), с присоединением His-метки на N-конце, содержащего мутацию P301S [иммуноген А], либо рекомбинантного тау человека размером 383 а.к. (4R0N), содержащего мутацию P301S, в котором отсутствовала N-концевая His-метка
10 [иммуноген В]. Иммуногены эмульгировали в адъюванте RIBI.

[0508] Самок мышей Balb/c в возрасте пять недель иммунизировали интраперитонеальным способом по 25 мкг иммуногена А в день 0 и по 10 мкг иммуногена А в каждый из дней 7, 14, 21, 27, 34, 48, 55 и 62. Мышей иммунизировали по 10 мкг иммуногена В в дни 76 и 90. В дни 43 и 98 у мышей отбирали кровь и титровали против
15 иммуногена А; в день 101 животным с наивысшими титрами вводили бустер-инъекцию посредством конечной иммунизации 50 мкг иммуногена В, который доставляли 1/2 интраперитонеальным способом и 1/2 внутривенным способом. Проводили скрининг слитых гибридом посредством ELISA против обоих иммуногенов.

[0509] Пример 2. Моноклональные антитела мыши связываются с тау в анализах
20 ELISA

[0510] Способы: Непрямой ELISA: 96-луночные полистирольные планшеты сенсibilизировали захватывающими антителами против 6xHis (фигура 1A) или поликлональными антителами против тау (Dako №A0024, фигура 1B), суспендированными в 1х ФБР, в течение 2 ч при к.т. (комнатной температуре) или 16 ч
25 при температуре 4°C. Нанесенный материал удаляли, и планшеты блокировали в течение 1 часа 1% БСА в 1х ФБР с последующей инкубацией с рекомбинантным тау человека с полигистидиновой меткой на N-конце белка (фигура 1A) или без нее (фигура 1B). После промывки планшеты инкубировали с указанными антителами, промывали и инкубировали с конъюгированным с ПХ (пероксидазой хрена) вторичным антителом козы против
30 иммуноглобулинов мыши. Реакцию в планшетах запускали добавлением ТМВ, и A₄₅₀ измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов.

[0511] Сэндвич-ELISA: 96-луночные полистирольные планшеты сенсibilизировали антителами против иммуноглобулинов мыши в 1х ФБР в течение 2 ч при к.т. или 16 ч при температуре 4°C. Нанесенный материал удаляли, и планшеты блокировали в течение 1
35 часа 1% БСА в 1х ФБР. Затем планшет инкубировали с указанными антителами в

идентичных концентрациях, разведенными в 0,1% БСА в 1х ФБР. Планшеты последовательно обрабатывали тау человека, поликлональными антителами кролика против тау (Dako №A0024) и конъюгированным с ПХ антителом козы против иммуноглобулинов кролика, все из которых были разведены в 0,1% БСА в ФБР, с промывками между каждым этапом. Добавляли стрептавидин-ПХ, реакцию в планшетах запускали добавлением ТМВ, и A_{450} измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов. См. фигуру 1С.

[0512] Результаты: Панель продуцированных гибридомой антител анализировали в отношении связывания с тау с помощью нескольких различных форматов ELISA.

Обнаружение тау подтверждали с применением непрямого формата, с применением тау-белка, иммобилизованного посредством его слитой с N-концом полигистидиновой метки (фигура 1А). Также подтверждали связывание с нативным немеченым белком (фигура 1В). Для оценки аффинности различных антител в растворе использовали формат сэндвич-ELISA, в котором исследуемые антитела гибридомы применяли в качестве захватывающих реактивов (фигура 1С).

[0513] Пример 3. Аффинность моноклональных антител мыши в отношении тау

[0514] Способы: анализ методом ППР (поверхностного плазмонного резонанса) проводили с применением прибора Biacore T200 для определения кинетики связывания антител мыши с рекомбинантным тау человека. Для подготовки поверхности сенсора антитело против иммуноглобулинов мыши (GE Life Sciences) иммобилизовали на сенсорный датчик CM5 посредством аминного сочетания, и антитело захватывали на уровне, который обеспечивал максимальное связывание 50 Е.О. (единиц ответа). Над захваченным лигандом пропускали различные концентрации рекомбинантного тау, варьирующие от 10 – 0,14 нМ, при скорости потока 50 мкл/мин. в буфере для анализа (HBS + 0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в течение 180 сек. ассоциации и 900 сек. диссоциации. Данные соотносили дважды как к нерелевантному сенсору, не содержащему лиганд антитела, так и к концентрации аналита 0 нМ для учета диссоциации лиганда от захватывающей молекулы. Затем данные анализировали с применением глобальной подгонки 1:1.

[0515] Результаты: Несколько антител мыши были выбраны в группе анализов ELISA на основании их характеристик, и их аффинности связывания оценивали методом ППР. Антитела исследовали в параллельных группах, и измеряли их скорости ассоциации и диссоциации связывания. Аффинности связывания представлены на фигуре 2.

[0516] Пример 4. Моноклональные антитела мыши предотвращают связывание тау человека с поверхностью иммортализованных нейронных клеток

[0517] Способы: Ингибирование связывания тау с клетками нейробластомы B103 с помощью моноклональных антител против тау

1. Клетки B103 ресуспендировали в ФБР в концентрации 5×10^5 клеток/мл. В планшет MSD High Bind высевали по 50 мкл суспензии клеток на лунку. Получали
5 концентрацию 25K клеток/лунку. Планшет накрывали, и позволяли клеткам присоединиться при температуре 37°C, 5% CO₂, в течение 2 ч.
2. После присоединения клеток из лунок удаляли ФБР посредством переворачивания планшета и аккуратного постукивания для удаления избытка буфера. В каждую лунку добавляли 50 мкл 3% Блокатора А MSD в ФБР или другого подходящего
10 блокирующего буфера и инкубировали планшет при к.т. в течение 1 часа без встряхивания.
3. В течение этапа блокирования планшета совместно инкубировали тау и антитела против тау следующим образом:
 - a. Начинали с антитела против тау в концентрации 2 мг/мл и готовили
15 серийные разведения в ФБР, в соотношении 1:2, для 7 дополнительных разведений.
 - b. Разводили тау в ФБР до концентрации 20 нМ. Концентрация тау в каждой лунке являлась постоянной.
 - c. Перемешивали тау и антитело против тау в соотношении 1:1 до конечной концентрации тау 10 нМ и начальной концентрации антитела против тау 1 мг/мл.
 - d. Инкубировали смесь в течение приблизительно 1 ч при к.т. при
20 встряхивании (600 об./мин.).
4. После блокирования планшета, этап 2, из лунок удаляли блокирующий буфер посредством переворачивания планшета и аккуратного постукивания и дважды промывали планшет ФБР с применением многоканальной пипетки. Убеждались, что
25 избыток буфера был полностью удален. Перед добавлением комплексов тау: антитело против тау охлаждали высевные клетки до температуры 4°C.
5. К высевным клеткам добавляли 50 мкл охлажденного комплекса, этап 3, и инкубировали на льду в течение 30 минут.
6. Дважды промывали планшет охлажденным ФБР, как описано ранее.
7. Добавляли 50 мкл 16B5.SULFO-TAG на лунку для обнаружения связанного с
30 поверхностью клеток тау. Инкубировали на льду в течение 30 минут.
8. Снова дважды промывали планшет охлажденным ФБР, как описано ранее.
9. Добавляли 150 мкл на лунку 1X буфера для считывания Т без поверхностно-активного вещества (разведенного в H₂O) и незамедлительно проводили считывание на

приборе MSD SECTOR™ 600. Избегали образования пузырьков при добавлении буфера для считывания.

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

[0518] Исследуемые антитела представляли собой антитела против тау 3D6, 16G7, 3H9, 4C5, 5G8 и изотипический контроль.

[0519] Результаты:

[0520] Снижение сигнала SulfoTag против тау, наблюдавшееся при увеличении концентрации исследуемого антитела, свидетельствует о функциональном блокировании связывания тау с поверхностями нейронных клеток. В случае изотипического контроля, 16G7 или 3H9 блокирования не наблюдалось. Увеличивающиеся количества функциональной блокирующей активности наблюдали в случае 4C5, 5G8 и 3D6. См. фигуру 3.

[0521] **Пример 5.** 3D6 и 5G8 иммунным способом захватывают тау из пораженной заболеванием ткани человека.

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

[0522] Результаты: Как показано на фигуре 4, антитела против тау 3D6 и 5G8 иммунопреципитировали тау из ткани, пораженной заболеванием Альцгеймера. Растворенные в высококонцентрированном солевом растворе фракции образывали иммунопреципитат с указанным антителом, и их обнаруживали с помощью поликлонального антитела против тау, направленного против отдельной области молекулы тау из связывающих сайтов для 3D6 и 5G8. 5G8 и 3D6 захватывали тау из данной фракции. Образцы на входе (растворенный в высококонцентрированном солевом растворе образец) представлены справа.

[0523] **Пример 6.** Дизайн гуманизированных антител 5G8

[0524] Исходной точкой или донорным антителом для гуманизации являлось антитело 5G8 мыши. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи зрелого m5G8 представлена в виде SEQ ID NO:9. Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи зрелого m5G8 представлена в виде SEQ ID NO:10.

5 Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно сводному определению Кэбота/Чотиа представлены в виде SEQ ID NO:11-13, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи согласно Кэботу представлены в виде SEQ ID NO:14-16, соответственно. Везде применяют нумерацию Кэбота.

10 [0525] CDR VH и VL 5G8 идентифицировали с применением правил Мартина для идентификации CDR на основании последовательности (Martin ACR. (2010). In: Kontermann R and Dübel S (eds). *Antibody Engineering*. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.). Варибельная область каппа (Vk) 5G8 принадлежит к подгруппе 2 Vk мыши, которая соответствует подгруппе 2 Vk человека, и варибельная
15 область тяжелой цепи (Vh) принадлежит к подгруппе 2c VH мыши, которая соответствует подгруппе 1 VH человека [Kabat E.A., et al., (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242]. CDR-L1 согласно Кэботу из 16 остатков подобен каноническому классу 4 Чотиа, CDR-L2 согласно Кэботу из 7 остатков представляет собой канонический класс Чотиа 1, CDR-L3 согласно Кэботу из 9 остатков
20 подобен каноническому классу Чотиа 1 в Vk [Martin A.C, and Thornton J.M. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:800-15.]. CDR-H1 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа из 10 остатков подобен каноническому классу Чотиа 1, CDR-H2 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа из 17 остатков подобен каноническому классу Чотиа 2 [Martin & Thornton, 1996]. CDR-H3 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа не имеет канонических
25 классов.

[0526] Последовательности VH и VL 5G8 использовали для поискового запроса в организованной базе данных антител программного обеспечения BioLuminate (Schrödinger, LLC; Zhu K, et al., (2014) *Proteins*. 82(8):1646–1655) в отношении белков с подобными аминокислотными последовательностями и известными структурами.

30 Структуру антитела 3F4 мыши против прионов с высокой степенью подобия (PDB ID: 1CR9; 1CR9_H; SEQ ID NO:27 и 1CR9_L; SEQ ID NO:30), обнаруженного Kascsak, *et al.* ((1987) *J Virol.* 61(12):3688-93) и секвенированного Kanyo, *et al.* ((1999). *J Mol Biol.* 293(4):855-63.), с разрешением 2,9 Å, выбрали для использования в качестве матрицы с целью построения модели 5G8 в BioLuminate. Последующий поисковый запрос в базе
35 данных BioLuminate в отношении антител, полученных от человека, позволил

обнаружить, что каркасные участки VH и VL 5G8 характеризуются высокой степенью подобия последовательности с соответствующими участками областей VH и VL гуманизированного Fab против дабигатрана aDabi-Fab2b (учетный № VH: 4YHM_H); учетный № VL: 4YHM_L), сконструированного Schiele, *et al.* ((2015) *MAbs*. 7(5):871-80.).

- 5 Вариабельные домены 5G8 и aDabi-Fab2b также характеризовались идентичными длинами CDR-H1, H2, петель L1, L2 и L3. Соответственно, каркасные участки VH (учетный № 4YHM_H; SEQ ID NO:28) и VL aDabi-Fab2b (учетный №. 4YHM_L; SEQ ID NO:31) были выбраны в качестве акцепторных последовательностей для CDR 5G8.

- [0527] Варианты последовательностей тяжелой и легкой цепей, которые получили в результате процесса гуманизации антитела, затем выравнивали с последовательностями зародышевой линии человека с применением инструмента IMGT Domain GapAlign для оценки степени гуманизации тяжелой и легкой цепей, как изложено в руководствах комитета МНН ВОЗ. (WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review) (интернет) 2014. Доступно по адресу <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) Остатки заменяли для выравнивания с соответствующей последовательностью зародышевой линии человека, когда это возможно, для усиления степени гуманизации. В случае гуманизированных вариантов VL_v5 и VL_v6 вводили мутации, чтобы сделать последовательности более подобными гену зародышевой линии человека IGKV2-29 (учетный № A2NJV5.2; SEQ ID NO:32). В случае гуманизированных вариантов VH_v7 и VH_v8 вводили мутации, чтобы сделать последовательности более подобными гену зародышевой линии человека IGHV1-46 (учетный № P01743.2; SEQ ID NO:29)

- [0528] Аминокислотные последовательности, состоящие из каркасных участков aDabi-Fab2b и CDR 5G8, обозначены hu5G8-VH_v1 и hu5G8-VL_v1. Конструировали дополнительные версии hu5G8-VH и hu5G8-VL, чтобы сделать возможной оценку различных каркасных остатков применительно к их вкладу в связывание с антигеном и иммуногенность. Положения, которые рассматривали для введения мутаций, включали таковые, которые:

- определяют конформации канонических CDR (обобщены в публикации Martin 2010)
- 30 -находятся в зоне Верньера (Foote J and Winter G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol*. 224(2):487-99),
- локализуются к поверхности взаимодействия домена VH/VL (обобщено в публикации Léger OJP and Saldanha J. (2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanization by CDR grafting. In: Shepherd P and Dean C (eds). *Monoclonal Antibodies: a Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press),
- 35

-способны подвергаться посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование или пироглутаминирование,

-заняты остатками, которые, как предсказывают, противоречат CDR, согласно модели CDR 5G8, перенесенных на каркасные участки aDabi-Fab2b, или

- 5 - заняты остатками, которые являются редкими среди секвенированных антител человека и в которых родительский остаток 5G8 мыши или какой-либо другой остаток является гораздо более распространенным.

[0529] Конструировали 8 вариантов гуманизированной переменной области тяжелой цепи и 6 вариантов гуманизированной переменной области легкой цепи, содержащие различные пермутации замен 8 иллюстративных гуманизированных зрелых переменных областей тяжелой цепи: hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7 и hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO: 33-40, соответственно) и hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5 и hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO: 41-46, соответственно). (таблицы 4 и 3).

- 10 Иллюстративные дизайны гуманизированных Vk и Vh с обратными мутациями и другими мутациями на основе отобранных каркасных участков человека представлены в таблицах 6 и 7, соответственно. Выделенные жирным шрифтом области в таблицах 6 и 7 отмечают CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа. «.» в столбцах в таблице 6 в случае hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5 и hu5G8-VL_v6 указывает, что
- 15 аминокислота в указанном положении является такой же, как и в hu5G8-VL_v1. «.» в столбцах в таблице 7 в случае hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7 и hu5G8-VH_v8 указывает, что аминокислота в указанном положении является такой же, как и в hu5G8-VH_v1. «-» в столбцах в таблицах 6 и 7 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO: 33-40 и SEQ ID NO:
- 20 41-46 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в таблице 8. Аминокислоты в положениях в hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7 и hu5G8-VH_v8 перечислены в таблице 9. Аминокислоты в положениях в hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5 и hu5G8-VL_v6 перечислены в таблице 10. Процент степени
- 25 гуманизации для гуманизированных цепей VH hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7 и hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO: 33-40, соответственно) по сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGHV1-46 и для гуманизированных цепей VL hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5 и hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO: 41-46,
- 30

соответственно) по сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGKV2-29 представлен в таблице 11.

Таблица 6

<u>Линейный № остатка</u>	<u>№ остатка согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VL 5G8 мыши (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 зародышевой линии, учетн. № A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Акцепторная aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
1	1	Fr1	D	D	D	D	.	.	.	.	.
2	2	Fr1	V	I	I	I	V	V	V	.	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	.	.	.	.	.
4	4	Fr1	M	M	M	M	.	.	.	.	.
5	5	Fr1	T	T	T	T	.	.	.	.	.
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
7	7	Fr1	T	T	T	T	.	.	S	.	.
8	8	Fr1	P	P	P	P	.	.	.	.	.
9	9	Fr1	L	L	L	L	.	.	.	.	.
10	10	Fr1	T	S	S	S	.	.	.	.	.
11	11	Fr1	L	L	L	L	.	.	.	.	.
12	12	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
13	13	Fr1	V	V	V	V	.	.	.	.	.
14	14	Fr1	T	T	T	T	.	.	.	.	.
15	15	Fr1	I	P	P	P	.	.	.	.	.
16	16	Fr1	G	G	G	G	.	.	.	.	.
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	.	.	E	.	.
18	18	Fr1	P	P	P	P	.	.	.	.	.
19	19	Fr1	A	A	A	A	.	.	.	.	.
20	20	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
21	21	Fr1	I	I	I	I	.	.	.	.	.
22	22	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
23	23	Fr1	C	C	C	C	.	.	.	.	.

<u>Линейный № остатка</u>	<u>№ остатка согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VL 5G8 мыши (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 зародышевой линии, учетн. № A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Акцепторная aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
24	24	CDR-L1	K	K	R	K	.	.	.	.	.
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
29	27B	CDR-L1	L	L	I	L	.	.	.	.	.
30	27C	CDR-L1	L	L	V	L	.	.	.	.	.
31	27D	CDR-L1	D	H	H	D	.	.	.	.	.
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
33	27F	CDR-L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	28	CDR-L1	D	D	D	D	.	.	.	.	.
35	29	CDR-L1	G	G	G	G	.	.	.	.	.
36	30	CDR-L1	K	K	N	K	.	.	.	.	.

<u>Линейный № остатка</u>	<u>№ остатка согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VL 5G8 мыши (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 зародышевой линии, учётн. № A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Акцепторная аDabi-Fab2b-VL, учётн. № 4YHM_L (SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
37	31	CDR-L1	T	T	I	T	.	.	.	.	.
38	32	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
39	33	CDR-L1	L	L	L	L	.	.	.	.	.
40	34	CDR-L1	N	Y	E	N	.	.	.	.	.
41	35	Fr2	W	W	W	W	.	.	.	.	.
42	36	Fr2	L	Y	Y	Y	L	L	L	.	L
43	37	Fr2	L	L	L	L	.	.	.	.	.
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
45	39	Fr2	R	K	K	K	.	.	.	.	.
46	40	Fr2	P	P	P	P	.	.	.	.	.
47	41	Fr2	G	G	G	G	.	.	.	.	.
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
49	43	Fr2	S	S	S	S	.	.	.	.	.
50	44	Fr2	P	P	P	P	.	.	.	.	.
51	45	Fr2	K	Q	K	K	.	.	.	Q	Q
52	46	Fr2	R	L	L	L	R	R	R	.	R
53	47	Fr2	L	L	L	L	.	.	.	.	.
54	48	Fr2	I	I	I	I	.	.	.	.	.
55	49	Fr2	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
56	50	CDR-L2	L	E	K	L	.	.	.	.	.
57	51	CDR-	V	V	V	V	.	.	.	.	.

<u>Линейный № остатка</u>	<u>№ остатка согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VL 5G8 мыши (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 зародышевой линии, учётн. № A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Акцепторная аDabi-Fab2b-VL, учётн. № 4YHM_L (SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
		L2									
58	52	CDR-L2	S	S	S	S	.	.	.	.	.
59	53	CDR-L2	K	S	Y	K	.	.	.	.	.
60	54	CDR-L2	L	R	R	L	.	.	.	.	.
61	55	CDR-L2	D	F	F	D	.	.	.	.	.
62	56	CDR-L2	S	S	S	S	.	.	.	.	.
63	57	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
64	58	Fr3	V	V	V	V	.	.	.	.	.
65	59	Fr3	P	P	P	P	.	.	.	.	.
66	60	Fr3	D	D	D	D	.	.	.	.	.
67	61	Fr3	R	R	R	R	.	.	.	.	.
68	62	Fr3	F	F	F	F	.	.	.	.	.
69	63	Fr3	T	S	S	S	.	.	.	.	.
70	64	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
71	65	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.
72	66	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
73	67	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.
74	68	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
75	69	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.
76	70	Fr3	D	D	G	G	.	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F	.	.	.	.	.

<u>Линейный № остатка</u>	<u>№ остатка согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VL 5G8 мыши (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 зародышевой линии, учётн. № A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Акцепторная аDabi-Fab2b-VL, учётн. № 4YHM_L (SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
78	72	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.
79	73	Fr3	L	L	L	L	.	.	.	.	.
80	74	Fr3	K	K	K	K	.	.	.	.	.
81	75	Fr3	I	I	I	I	.	.	.	.	.
82	76	Fr3	R	S	S	S	.	.	.	.	.
83	77	Fr3	R	R	R	R	.	.	.	.	.
84	78	Fr3	V	V	V	V	.	.	.	.	.
85	79	Fr3	E	E	E	E	.	.	.	.	.
86	80	Fr3	A	A	A	A	.	.	.	.	.
87	81	Fr3	E	E	E	E	.	.	.	.	.
88	82	Fr3	D	D	D	D	.	.	.	.	.
89	83	Fr3	L	V	V	V	.	.	.	.	.
90	84	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
91	85	Fr3	V	V	V	V	.	.	.	.	.
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
94	88	Fr3	C	C	C	C	.	.	.	.	.
95	89	CDR-L3	W	M	F	W	.	.	.	.	.
96	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
97	91	CDR-L3	G	-	A	G	.	.	.	.	.
98	92	CDR-L3	T	-	S	T	.	.	.	.	.
99	93	CDR-L3	L	-	H	L	.	.	.	.	.

<u>Линейный № остатка</u>	<u>№ остатка согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VL 5G8 мыши (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 зародышевой линии, учетн. № A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Акцепторная аDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
		L3									
100	94	CDR-L3	F	-	V	F	.	.	.	.	.
101	95	CDR-L3	P	-	P	P	.	.	.	.	.
102	95A	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	95B	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	95C	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	95D	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	95E	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	95F	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	96	CDR-L3	Y	G	Y	Y	.	.	.	.	.
109	97	CDR-L3	T	I	T	T	.	.	.	.	.
110	98	Fr4	F	H	F	F	.	.	.	.	.
111	99	Fr4	G	L	G	G	.	.	.	.	.
112	100	Fr4	G	P	G	G	.	.	.	.	.
113	101	Fr4	G		G	G	.	.	.	.	.
114	102	Fr4	T		T	T	.	.	.	.	.

<u>Линейный № остатка</u>	<u>№ остатка согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VL 5G8 мыши (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 зародышевой линии, учетн. № A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Акцепторная aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
115	103	Fr4	K		K	K	.	.	.	.	.
116	104	Fr4	L		L	L	.	.	.	.	.
117	105	Fr4	E		E	E	.	.	.	.	.
118	106	Fr4	I		I	I	.	.	.	.	.
119	106A	Fr4	-		-	-	-	-	-	-	-
120	107	Fr4	K		K	K	.	.	.	.	.

5

10

Таблица 7

<u>Линейный остаток</u>	<u>Остаток согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VH 5G8 мыши (SEQ ID NO: 7)</u>	<u>IGHV1-46 зародышевой линии, учетн. № P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>	<u>Акцептор, учетн. № 4YHM H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>	<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>	<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>	<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>	<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>	<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>	<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>	<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>	<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>
1	1	Fr1	E	Q	Q	Q	.	E	E	E	E	.	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	.	.	.	.	.	.	.
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.	.	.
4	4	Fr1	L	L	L	L	.	.	.	.	.	.	.
5	5	Fr1	Q	V	V	V	.	.	.	.	.	.	.
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.	.	.
7	7	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
8	8	Fr1	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
9	9	Fr1	A	A	A	A	.	.	.	.	.	.	.
10	10	Fr1	E	E	E	E	.	.	.	.	.	.	.
11	11	Fr1	L	V	V	V	.	.	.	L	L	.	.
12	12	Fr1	V	K	K	K	.	.	.	V	V	.	.
13	13	Fr1	R	K	K	K	.	.	.	.	.	.	.
14	14	Fr1	S	P	P	P	.	.	.	.	.	.	.
15	15	Fr1	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
16	16	Fr1	A	A	A	A	.	.	.	.	.	.	.
17	17	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
18	18	Fr1	V	V	V	V	.	.	.	.	.	.	.
19	19	Fr1	R	K	K	K	.	.	.	R	R	.	.
20	20	Fr1	L	V	V	V	.	.	.	L	L	.	.
21	21	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
22	22	Fr1	C	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.
23	23	Fr1	T	K	K	K	.	.	.	.	A	.	.
24	24	Fr1	A	A	A	A	.	.	.	.	.	.	.
25	25	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.

<u>Линейный остаток</u>	<u>Остаток согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VH 5G8 мыши (SEQ ID NO: 7)</u>	<u>IGHV1-46 зародышевой линии, учетн. № P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>	<u>Акцептор. учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>	<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>	<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>	<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>	<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>	<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>	<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>	<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>	<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
27	27	CDR-H1	F	Y	Y	F	.	.	.	.	.	.	.
28	28	CDR-H1	N	T	T	N	.	.	.	.	.	.	.
29	29	CDR-H1	I	F	F	I	.	.	.	.	.	.	.
30	30	CDR-H1	K	T	T	K	.	.	.	.	.	.	.
31	31	CDR-H1	D	S	D	D	.	.	.	.	.	.	.
32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
34	34	CDR-H1	M	M	M	M	.	.	.	.	.	.	.
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	.	.	.	.	.	.	.
36	35A	CDR-H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	35B	CDR-H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	36	Fr2	W	W	W	W	.	.	.	.	.	.	.

<u>Линейный остаток</u>	<u>Остаток согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VH 5G8 мыши (SEQ ID NO: 7)</u>	<u>IGHV1-46 зародышевой линии, учетн. № P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>	<u>Акцептор. учетн. № 4YHM H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>	<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>	<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>	<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>	<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>	<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>	<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>	<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>	<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>
58	53	CDR-H2	E	S	R	E	.	.	.	.	.	.	.
59	54	CDR-H2	N	G	N	N	.	.	.	.	.	.	.
60	55	CDR-H2	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
61	56	CDR-H2	D	S	G	D	.	.	.	.	.	.	.
62	57	CDR-H2	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
63	58	CDR-H2	V	S	T	V	.	.	.	.	.	.	.
64	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
65	60	CDR-H2	A	A	N	A	.	.	.	.	.	.	.
66	61	CDR-H2	P	Q	E	P	.	.	.	.	.	.	.
67	62	CDR-H2	K	K	K	K	.	.	.	.	.	.	.
68	63	CDR-H2	F	F	F	F	.	.	.	.	.	.	.
69	64	CDR-H2	Q	Q	K	Q	.	.	.	.	.	.	.
70	65	CDR-	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.

<u>Линейный остаток</u>	<u>Остаток согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VH 5G8 мыши (SEQ ID NO: 7)</u>	<u>IGHV1-46 зародышевой линии, учетн. № P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>	<u>Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>	<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>	<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>	<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>	<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>	<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>	<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>	<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>	<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>
		H2											
71	66	Fr3	K	R	K	K	.	.	.	.	.	R	R
72	67	Fr3	A	V	A	A	.	.	.	.	.	V	V
73	68	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
74	69	Fr3	M	M	M	M	.	.	.	.	.	.	.
75	70	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
76	71	Fr3	S	R	R	R	S	S	S	S	S	.	S
77	72	Fr3	D	D	D	D	.	.	.	.	.	.	.
78	73	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
79	74	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
80	75	Fr3	S	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
81	76	Fr3	N	S	S	S	.	.	.	N	N	.	.
82	77	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
83	78	Fr3	A	V	A	A	.	.	.	.	.	V	V
84	79	Fr3	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
85	80	Fr3	L	M	M	M	.	.	.	L	L	.	.
86	81	Fr3	H	E	E	E	.	.	.	.	.	.	.
87	82	Fr3	L	L	L	L	.	.	.	.	.	.	.
88	82A	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
89	82B	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
90	82C	Fr3	L	L	L	L	.	.	.	.	.	.	.
91	83	Fr3	T	R	R	R	.	.	.	.	.	.	.
92	84	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
93	85	Fr3	E	E	E	E	.	.	.	.	.	.	.
94	86	Fr3	D	D	D	D	.	.	.	.	.	.	.

<u>Линейный остаток</u>													
<u>Остаток согласно Кэботу</u>													
<u>FR или CDR</u>													
<u>VH 5G8 мыши (SEQ ID NO: 7)</u>													
<u>IGHV1-46 зародышевой линии, учетн. № P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>													
<u>Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>													
<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>													
<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>													
<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>													
<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>													
<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>													
<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>													
<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>													
<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>													
		H3											
112	100D	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	100E	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	100F	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
115	100G	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
116	100H	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	100I	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	100J	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
119	100K	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	101	CDR-H3	D		D	D	.	.	.	.	.	.	.
121	102	CDR-H3	F		Y	F	.	.	.	.	.	.	.
122	103	Fr4	W		W	W	.	.	.	.	.	.	.
123	104	Fr4	G		G	G	.	.	.	.	.	.	.
124	105	Fr4	Q		Q	Q	.	.	.	.	.	.	.
125	106	Fr4	G		G	G	.	.	.	.	.	.	.

<u>Линейный остаток</u>	<u>Остаток согласно Кэботу</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VH 5G8 мыши (SEQ ID NO: 7)</u>	<u>IGHV1-46 зародышевой линии, учетн. № P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>	<u>Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>	<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>	<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>	<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>	<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>	<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>	<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>	<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>	<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>
126	107	Fr4	T		T	T	.	.	.	.	.	.	.
127	108	Fr4	T		L	L	.	.	.	.	.	.	.
128	109	Fr4	L		V	V	.	.	.	.	.	.	.
129	110	Fr4	T		T	T	.	.	.	.	.	.	.
130	111	Fr4	V		V	V	.	.	.	.	.	.	.
131	112	Fr4	S		S	S	.	.	.	.	.	.	.
132	113	Fr4	S		S	S	.	.	.	.	.	.	.

Таблица 8

Обратные мутации и другие мутации V_H, V_L для гуманизированного 5G8

Вариант V_H или V_L	Экзон акцепторной последовательности V_H или V_L	Изменения по сравнению с остатками акцепторного каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа)
hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	Отсутствуют
hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H48, H71, H93, H94
hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H48, H71, H93, H94

Вариант V_H или V_L	Экзон акцепторной последовательности V_H или V_L	Изменения по сравнению с остатками акцепторного каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа)
	NO:28)	
hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H46, H48, H71, H93, H94
hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93, H94
hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H11, H12, H19, H20, H23, H46, H48, H71, H76, H80, H93, H94
hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H66, H67, H78, H93, H94
hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H46, H48, H66, H67, H71, H78, H93, H94
hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	отсутствуют
hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	L2, L36, L46
hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)	Акцепторный aDabi-Fab2b-VL, учетн. №4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	L2, L36, L46, L70
hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	L2, L7, L17, L36, L46, L70

Вариант V _H или V _L	Экзон акцепторной последовательности V _H или V _L	Изменения по сравнению с остатками акцепторного каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа)
	31)	
hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	L45, L70
hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	L2, L36, L45, L46, L70

Таблица 9

Нумерация Кэбота остатков каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 5G8

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	VH 5G8 мыши (SEQ ID NO: 7)	hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)	hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)	hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)	hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)	hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)	hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)	hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)	hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)
H1	Q	E	Q	Q	E	E	E	E	Q	E
H11	V	L	V	V	V	V	L	L	V	V
H12	K	V	K	K	K	K	V	V	K	K
H19	K	R	K	K	K	K	R	R	K	K
H20	V	L	V	V	V	V	L	L	V	V
H23	K	T	K	K	K	K	K	A	K	K

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор. учётн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	VH 5G8 мыши (SEQ ID NO: 7)	hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)	hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)	hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)	hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)	hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)	hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)	hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)	hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)
H46	E	E	E	E	E	D	D	D	E	D
H48	M	I	M	I	I	I	I	I	M	I
H66	K	K	K	K	K	K	K	K	R	R
H67	A	A	A	A	A	A	A	A	V	V
H71	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S
H76	S	N	S	S	S	S	N	N	S	S
H78	A	A	A	A	A	A	A	A	V	V
H80	M	L	M	M	M	M	L	L	M	M
H93	T	S	T	S	S	S	S	S	A	S
H94	I	P	I	P	P	P	P	P	R	P

Таблица 10

Нумерация Кэбота остатков каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 5G8

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учётн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	VL 5G8 мыши (SEQ ID NO:8)	hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)	hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)	hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)	hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)	hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)	hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)
L2	I	V	I	V	V	V	I	V
L7	T	T	T	T	T	S	T	T
L17	Q	Q	Q	Q	Q	E	Q	Q
L36	Y	L	Y	L	L	L	Y	L
L45	K	K	K	K	K	K	Q	Q

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	VL 5G8 мыши (SEQ ID NO:8)	hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)	hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)	hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)	hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)	hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)	hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)
L46	L	R	L	R	R	R	L	R
L70	G	D	G	G	D	D	D	D

Таблица 11

Процент степени гуманизации тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител 5G8

Вариант V _H или V _L	% степени гуманизации
hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)	84,4%
hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)	81,4%
hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)	80,4%
hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)	79,4%
hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)	73,2%
hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)	72,2%
hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)	87,8%
hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)	82,5%
hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)	88,0%
hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)	85,0%
hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)	86,0%
hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)	84,0%
hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)	90,0%
hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)	87,0%

5

[0530] Положения, в которых остатки канонического класса Чотиа, верньерные остатки или остатки поверхности взаимодействия/остатки упаковки отличаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами для замены. Примеры остатков канонического класса Чотиа включают остатки L2, L27B, L27C, L34, L94, H29, H71 и H94 согласно Кэботу в таблицах 3 и 4. Примеры верньерных

10

остатков включают остатки L2, L36, L46, H27, H28, H29, H30, H48, H71, H78, H93 и H94 согласно Кэботу в таблицах 3 и 4. Примеры остатков поверхности взаимодействия/остатков упаковки (VH+VL) включают остатки L34, L36, L46, L89, L91, H93 и H95 согласно Кэботу в таблицах 3 и 4.

5 **[0531]** Основания для выбора положений, указанных в таблице 6 в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

[0532] L2 (I2V) представляет собой обратную мутацию канонического остатка и верньерного остатка.

10 **[0533]** L7 (T2S) представляет собой мутацию от остатка (T), который редко встречается в данном положении у людей, к остатку, который встречается более часто (S).

[0534] L17 (Q17E) представляет собой мутацию от остатка (Q), который редко встречается в данном положении у людей, к остатку, который встречается более часто (E).

[0535] L36 (Y36L) представляет собой обратную мутацию верньерного остатка и остатка поверхности взаимодействия.

15 **[0536]** L45 (K45Q) представляет собой мутацию к остатку зародышевой линии IGKV2-29.

[0537] L46 (G46R) представляет собой обратную мутацию верньерного остатка и остатка поверхности взаимодействия.

20 **[0538]** L70 (G70D) представляет собой обратную мутацию и представляет собой мутацию к остатку зародышевой линии IGKV2-29. D часто встречается в данном положении у людей.

[0539] Основания для гуманизированных вариантов, указанных в таблице 6 в варибельной области легкой цепи, являются следующими.

[0540] *Hu5G8-VL_v1* состоит из петель CDR-L1, L2 и L3 5G8-VL, перенесенных на каркасный участок aDabi-Fab2b-VL.

25 **[0541]** *Hu5G8-VL_v2* восстанавливает все замены каркасного участка в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов Чотиа, являются частью зоны Верньера или расположены возле поверхности взаимодействия доменов VH/VL. Положение 2 согласно Кэботу определяет каноническую конформацию Чотиа CDR-L1; положения 2, 36 и 46 согласно Кэботу являются частью зоны Верньера; и
30 положения 36 и 46 согласно Кэботу также локализируются к поверхности взаимодействия VH/VL. *hu5G8-VL_v2* содержит обратные мутации I2V, Y36L и L46R, чтобы сделать возможной оценку вклада данных положений в аффинность связывания с антигеном и иммуногенность.

[0542] *Hu5G8-VL_v3* является таким же, что и *hu5G8-VL-v2*, и дополнительно восстанавливает все замены каркасного участка в положениях, в которых родительская аминокислота 5G8-VL мыши более распространена в секвенированных антителах человека по сравнению с остатком aDabi-Fab2b-VL. В положении 70 согласно Кэботу 5 остаток 5G8-VL является более распространенным в антителах человека, чем остаток aDabi-Fab2b-VL. *Hu5G8-VL_v3* содержит обратную мутацию G70D, которая восстанавливает родительский каркасный остаток 5G8-VL, одновременно увеличивая степень гуманизации последовательности.

10 [0543] *Hu5G8-VL_v4* является таким же, что и *hu5G8-VL-v3*, но дополнительно содержит замены в каркасных положениях, в которых ни остаток aDabi-Fab2b-VL, ни остаток 5G8-VL не является наиболее распространенным среди секвенированных антител человека. В положении 7 согласно Кэботу наиболее распространенным остатком является S, который не присутствует в aDabi-Fab2b-VL (T) или 5G8-VL (T); и в положении 17 согласно Кэботу 15 наиболее распространенным остатком является E, который не присутствует в aDabi-Fab2b-VL (Q) или 5G8-VL (Q). *Hu5G8-VL_v4* содержит мутации T7S и Q17E для увеличения степени гуманизации последовательности.

[0544] *Hu5G8-VL_v5* состоит из петель CDR-L1, L2 и L3 5G8-VL, перенесенных на 20 каркасный участок aDabi-Fab2b-VL, как в *hu5G8-VL_v1*, и дополнительно содержит мутации каркасного участка, которые делают последовательность более подобной конкретному гену зародышевой линии варибельной области каппа иммуноглобулина человека. Каркасный участок aDabi-Fab2b-VL, а вследствие этого таковой *hu5G8-VL_v1*, характеризуется высокой степенью подобия последовательности с геном зародышевой 25 линии человека IGKV2-29 с отличиями в положениях 45 и 70 согласно Кэботу. *Hu5G8-VL_v5* содержит мутации K45Q и G70D в качестве другой стратегии увеличения степени гуманизации последовательности.

[0545] *Hu5G8-VL_v6* содержит мутации *hu5G8-VL-v5* и дополнительно содержит мутации, 30 введенные в *hu5G8-VL-v2*, а именно – восстанавливающие все замены каркасного участка в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов Чотиа, являются частью зоны Верньера или расположены возле поверхности взаимодействия домена VH/VL (обратные мутации I2V, Y36L и L46R).

[0546] Основания для выбора положений, указанных в таблице 7 в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

[0547] H1 (Q1E) представляет собой обратную мутацию и представляет собой мутацию, усиливающую стабильность, для снижения потенциала образования пироглутамата. (Liu, 2011, ссылка выше).S

[0548] H11 (V11L) представляет собой обратную мутацию. L часто встречается в данном положении у людей.

[0549] H12 (K12V) представляет собой обратную мутацию. V часто встречается в данном положении у людей.

10 **[0550]** H19 (K19R) представляет собой обратную мутацию. R часто встречается в данном положении у людей.

[0551] H20 (V20L) представляет собой обратную мутацию. L часто встречается в данном положении у людей.

15 **[0552]** H23 (K23A) представляет собой мутацию к остатку, который часто встречается в данном положении у людей.

[0553] H46 (E46D) представляет собой консервативную мутацию. E46, как предсказывают, противоречит K62 в CDR-H2.

[0554] H48 (M48I) представляет собой обратную мутацию в верньерной зоне. I часто встречается в данном положении у людей.

20 **[0555]** H66 (K66R) представляет собой мутацию к остатку зародышевой линии IGHV1-46. K редко встречается в данном положении у людей. R наиболее часто встречается в данном положении.

[0556] H67 (A67V) представляет собой мутацию к остатку зародышевой линии IGHV1-46. A редко встречается в данном положении у людей. V наиболее часто встречается в данном
25 положении.

[0557] H71 (R71S) представляет собой обратную мутацию канонического и верньерного остатка.

[0558] H76 (S76N) представляет собой обратную мутацию. N часто встречается в данном положении у людей.

30 **[0559]** H78 (A78V) представляет собой мутацию к остатку зародышевой линии IGHV1-46.

[0560] H80 (M80L) представляет собой обратную мутацию. L часто встречается в данном положении у людей.

[0561] H93 (T93S или T93A) T93S представляет собой обратную мутацию верньерного остатка и остатка поверхности взаимодействия. T93A представляет собой мутацию к

остатку зародышевой линии IGHV1-46. Т и S редко встречаются в данном положении у людей. А наиболее часто встречается в данном положении у людей.

[0562] Н94 (I94P или I94R) I94P представляет собой обратную мутацию канонического и верньерного остатка. I94R представляет собой мутацию к остатку зародышевой линии IGHV1-46. I и Р редко встречаются в данном положении у людей. Р наиболее часто встречается в данном положении у людей.

[0563] Основания для гуманизированных вариантов, указанных в таблице 7 в вариабельной области тяжелой цепи, являются следующими.

[0564] *Hu5G8-VH_v1* состоит из петель CDR-H1, H2 и H3 5G8-VH, перенесенных на каркасный участок aDabi-Fab2b-VH.

[0565] *Hu5G8-VH_v2* восстанавливает все замены каркасного участка в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов Чотиа, являются частью зоны Верньера или локализируются к поверхности взаимодействия доменов VH/VL. Положения 71 и 94 согласно Кэботу определяют каноническую конформацию Чотиа CDR-H2 и CDR-H1, соответственно; положения 48, 71, 93 и 94 согласно Кэботу являются частью зоны Верньера; и положение 93 согласно Кэботу локализуется к поверхности взаимодействия домена VH/VL. *Hu5G8-VH_v2* содержит обратные мутации M48I, R71S, T93S и I94P, чтобы сделать возможной оценку вклада данных положений в аффинность связывания с антигеном и иммуногенность.

[0566] *Hu5G8-VH_v3* содержит обратные мутации *hu5G8-VH-v2* и дополнительно восстанавливает замену каркасного участка в положении 1 согласно Кэботу. На N-конце белков как Е, так и Q, как известно, спонтанно циклизируются с образованием пироглутамата; однако конверсия Е происходит более медленно, чем Q (Liu YD, et al., (2011) *J Biol Chem.* 286(13):11211-7.; Schilling S, et al., (2008) *Biol Chem.* 389(8):983-91.).

Hu5G8-VH-v3 содержит обратную мутацию Q1E для снижения пироглутаминирования.

[0567] *Hu5G8-VH_v4* содержит обратные мутации *hu5G8-VH-v3* и дополнительно содержит мутации каркасных остатков, которые, как предсказывает программное обеспечение BioLuminate, препятствуют CDR. На основании вандерваальсовых взаимодействий предсказывают, что Е в положении 46 согласно Кэботу препятствует К в положении 62 CDR-H2 согласно Кэботу. *Hu5G8-VH_v4* содержит консервативную мутацию E46D.

[0568] *Hu5G8-VH_v5* содержит мутации *hu5G8-VH-v4* и дополнительно восстанавливает все замены каркасного участка в положениях, в которых родительская аминокислота 5G8-VH мыши более распространена в секвенированных антителах человека по сравнению с остатком aDabi-Fab2b-VH. В положениях 11, 12, 19, 20, 76 и 80 согласно Кэботу остаток

5G8-VH является более распространенным в антителах человека, чем остаток aDabi-Fab2b-VH. Hu5G8-VH_v5 содержит обратные мутации V11L, K12V, K19R, V20L, S76N и M80L, которые восстанавливают родительские каркасные остатки 5G8-VH, одновременно увеличивая степень гуманизации последовательности.

5

[0569] *Hu5G8-VH_v6* содержит мутации *hu5G8-VH-v5* и дополнительно содержит замены в каркасных положениях, в которых ни остаток aDabi-Fab2b-VH, ни остаток 5G8-VH не является наиболее распространенным среди секвенированных антител человека. В положении 23 согласно Кэботу наиболее распространенным остатком является А, который не присутствует в aDabi-Fab2b-VH (К) или 5G8-VH (Т). *Hu5G8-VH_v6* содержит мутацию K23A для увеличения степени гуманизации последовательности. В *hu5G8-VH_v6* следующие положения согласно Кэботу не подвергали мутации к наиболее распространенному остатку в связи с их расположением в или поблизости от поверхности взаимодействия или зоны Верньера:

10

15

20

- положение 66: R встречается наиболее часто; aDabi-Fab2b-VH (К) и 5G8-VH (К);
- положение 67: V встречается наиболее часто; aDabi-Fab2b-VH (А) и 5G8-VH (А);
- положение 93: А встречается наиболее часто; aDabi-Fab2b-VH (Т) и 5G8-VH (S); and
- положение 94: R встречается наиболее часто; aDabi-Fab2b-VH (I) и 5G8-VH (P).

25

30

[0570] *Hu5G8-VH_v7* состоит из петель CDR-H1, H2 и H3 5G8-VH, перенесенных на каркасный участок aDabi-Fab2b-VH, как в *hu5G8-VH_v1*, и дополнительно содержит мутации каркасного участка, которые делают последовательность более подобной конкретному гену зародышевой линии варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Каркасный участок aDabi-Fab2b-VH, а вследствие этого таковой *hu5G8-VH_v1*, характеризуется высокой степенью подобия последовательности с геном зародышевой линии человека IGHV1-46 с отличиями в положениях 66, 67, 78, 93 и 94 согласно Кэботу. *Hu5G8-VH_v7* содержит мутации K66R, A67V, A78V, T93A и I94R в качестве другой стратегии увеличения степени гуманизации последовательности.

[0571] *Hu5G8-VH_v8* содержит мутации *hu5G8-VH-v7* и дополнительно содержит мутации, введенные в *hu5G8-VH-v2*, 3 и 4, а именно:

- 5 ○ восстановление всех замен в каркасном участке в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов Чотиа, являются частью зоны Верньера или локализуются к поверхности взаимодействия доменов VH/VL (обратные мутации M48I, R71S, A93S и R94P),
- восстановление замены в каркасном участке в положении 1 согласно Кэботу для снижения пироглутаминирования (обратная мутация Q1E), и
- 10 ○ введение мутаций в каркасные остатки, которые, как предсказывает программное обеспечение BioLuminate, препятствуют CDR (консервативная мутация E46D).

[0572] Гуманизированные последовательности были получены с применением двухэтапного протокола ПЦР, который позволяет вводить несколько мутаций, делеций и вставок с применением сайт-направленного мутагенеза QuikChange [Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) BioTechniques 26:680-682).

Вариабельные области тяжелой цепи

[0573] > 5G8-VH (SEQ ID NO: 7)
EVQLQQSGAELVRSGASVRLSCTASGFNIKDYMHVWRQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
20 VYAPKFQGKATMTSDTSSNTAYLHLSSLTSEDVAVYYCSPLDFWGQGTTTLTVSS

[0574] >3F4-VH, учетный № 1CR9_H (SEQ ID NO: 27)
KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIYQWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGNSE
YAPRFQGKATMTADTLSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCNADLHDYWGQGTTTLTVSS

25 [0575] >aDabi-Fab2b-VH, учетный № 4YHM_H (SEQ ID NO:28)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYMHVWRQAPGQGLEWMGETNPRNG
GTTYNEKFKGKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTIGTSGYDYFDYWGQGT
LTVSS

30 [0576] >IGHV1-46, учетный № P01743.2 (SEQ ID NO:29)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGS
TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR

35 [0577] > hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO: 33)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENG
DTVYAPKFQGKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCTILDFWGQGTLLTVSS

[0578] > hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWIGWIDPENGD
TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

[0579] > hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO: 35)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWIGWIDPENGD
10 TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

[0580] > hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS
15

[0581] > hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
TVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

20 **[0582]** > hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCAASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
TVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

[0583] > hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO: 39)

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENG
DTVYAPKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARLDFWGQGTLLTVSS

[0584] > hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
30 TVYAPKFQGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

Вариабельные области легкой цепи kappa

[0585] >5G8-VL(SEQ ID NO:8)

DVVMQTQTPLTSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKIRRVEAEDLGVYYCWQGTLPYTFGGGGTKLEIK

[0586] >3F4-VL, учетный № 1CR9_L (SEQ ID NO:30)

5 DVVMQTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLIWVFQRPQGQSPKRLIFLVSKRDS
GVVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPHTVGGGGTKLEIA

[0587] >aDabi-Fab2b-VL, учетный № 4YHM_L (SEQ ID NO:31)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSDGNIYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSYSRFS
10 GVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHVPYTFGGGGTKLEIK

[0588] >IGKV2-29, учетный № A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVSSRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLP
15

[0589] > hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWYLQKPGQSPKLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGGTKLEIK

20 **[0590]** > hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)

DVVMQTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGGTKLEIK

[0591] > hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)

25 DVVMQTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGGTKLEIK

[0592] > hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)

DVVMQTQSPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLD
30 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGGTKLEIK

[0593] > hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGGTKLEIK

[0594] > hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)

DVVMQTPTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKEIK

5 [0595] **Пример 7.** Дизайн гуманизированных антител 6A10

[0596] Исходной точкой для гуманизации моноклонального антитела 6A10 являлось антитело 6A10 мыши. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи зрелого 6A10 представлена в виде SEQ ID NO:63. Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи зрелого 6A10 представлена в виде
10 SEQ ID NO:64. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно сводному определению Кэбота/Чотиа представлены в виде SEQ ID NO:65-67, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи согласно Кэботу представлены в виде SEQ ID NO:68-70, соответственно. Везде применяют нумерацию Кэбота.

15

[0597] Вариабельная область каппа (Vk) 6A10 принадлежит к подгруппе 2 мыши согласно Кэботу, которая соответствует подгруппе 3 человека согласно Кэботу, и вариабельная область тяжелой цепи (Vh) принадлежит к подгруппе 2с мыши согласно Кэботу, которая соответствует подгруппе 1 человека согласно Кэботу [Kabat E.A., et al, (1991) Sequences of
20 Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242.]. CDR-L1 из 16 остатков принадлежит к каноническому классу 4, CDR-L2 из 7 остатков – классу 1, CDR-L3 из 9 остатков – классу 1 в Vk [Martin A.C. and Thornton J.M. (1996) J. Mol. Biol. 263:800-815.]. CDR-H1 из 10 остатков принадлежит к классу 1, CDR-H2 из 17 остатков – классу 1 [Martin & Thornton, 1996]. CDR-H3 не имеет канонических классов.

25

[0598] Остатки на поверхности взаимодействия между доменами Vk и Vh являются остатками, которые часто обнаруживают, за исключением того, что 93Т в тяжелой цепи, как правило, представляет собой аланин; вследствие этого данный остаток анализируют в качестве мишени для обратной мутации. Аналогично, 36L в Vk, как правило, представляет собой Y или F, и 46R, как правило, представляет собой L, вследствие этого данные
30 остатки также анализируют в отношении обратных мутаций.

[0599] Проводили поиск среди белковых последовательностей в базе данных PDB [Deshpande N. et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33: D233-D237.] для обнаружения структур,
35 которые обеспечат грубую структурную модель 6A10. Для структуры Vk использовали

кристаллическую структуру fab антитела [код pdb 1CR9; SEQ ID NO:30] [Kanyo Z.F. et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:855-863.], поскольку она характеризовалась высоким разрешением (2,0 Å) и общим подобием последовательности Vk 6A10 с сохранением тех же канонических структур для петель. Ту же структуру [код pdb 1CR9; SEQ ID NO:27] использовали для структуры Vh, поскольку она характеризовалась высоким общим подобием последовательности и достаточно хорошим разрешением (2,0 Å). Помимо этого, CDR-H1 и H2 характеризуются теми же каноническими структурами, что и Vh 6A10. Для моделирования грубой структуры 6A10 использовали программное обеспечение Bioluminate. Данное программное обеспечение было лицензировано компанией Schrodinger Inc.

[0600] Поиск в избыточной базе данных белковых последовательностей от NCBI позволил провести отбор подходящих каркасных участков человека, в которые переносили CDR мыши. Для Vk выбрали вариабельную область легкой цепи каппа человека с учетным № ABC66863 [SEQ ID NO:83; Shriner, A.K., et al., (2016) 24:7159-7166]. Данная последовательность характеризуется теми же каноническими классами для CDR-L1 и L2 и является членом подгруппы 3 согласно Кэботу каппа человека. Для Vh выбрали вариабельную область тяжелой цепи человека с учетным № ACR16112 [SEQ ID NO: 81; Williams, J.V et al., (2009) *Mol. Immunol.* 47:407-414]. Данная последовательность характеризуется теми же каноническими классами и является членом подгруппы 1 согласно Кэботу тяжелой цепи человека.

[0601] Конструировали 3 варианта гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи и 3 варианта гуманизированной вариабельной области легкой цепи, содержащие различные пермутации замен, hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2 и hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO: 85-87, соответственно) и hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2 и hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO: 88-90, соответственно) (таблицы 12 и 13). Иллюстративные дизайны гуманизированных VL и VH с обратными мутациями и другими мутациями на основе отобранных каркасных областей человека представлены в таблицах 12 и 13, соответственно. Выделенные жирным шрифтом области в таблицах 12 и 13 отмечают CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа. «-» в столбцах в таблицах 12 и 13 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO:85-87 и SEQ ID NO: 88-90 содержат обратные мутации и другие мутации, как представлено в таблице 14. Аминокислоты в положениях в hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2 и hu6A10-VH_v3 перечислены в таблице 15. Аминокислоты в положениях в hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2 и hu6A10-VL_v3 перечислены в таблице 16. Процент степени гуманизации для гуманизированных цепей VH hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2 и hu6A10-VH_v3 (SEQ ID

NO: 85-87, соответственно) по сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGHV1-2*02 (SEQ ID NO:82), а также для гуманизированных цепей VL hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2 и hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:88-90, соответственно) по сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:84) представлен в таблице 17.

Таблица 12

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VL 6A10 мыши (SEQ ID NO:64)	Акцептор, учёт. № ABC66863 (SEQ ID NO:83)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	P	P	P	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	L	L	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	E
18	18	Fr1	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VL 6A10 мыши (SEQ ID NO:64)	Акцептор, учетн. № ABC66863 (SEQ ID NO:83)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
21	21	Fr1	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	R	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S	S
29	27B	CDR-L1	L	L	L	L	L
30	27C	CDR-L1	L	V	L	L	L
31	27D	CDR-L1	D	Y	D	D	D
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S	S
33	27F	CDR-L1	—	—	—	—	—
34	28	CDR-L1	D	D	D	D	D
35	29	CDR-L1	G	G	G	G	G
36	30	CDR-L1	K	N	K	K	K
37	31	CDR-L1	T	T	T	T	T
38	32	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
39	33	CDR-L1	L	L	L	L	L
40	34	CDR-L1	N	N	N	N	N
41	35	Fr2	W	W	W	W	W
42	36	Fr2	L	F	F	F	F
43	37	Fr2	L	Q	Q	Q	Q
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
45	39	Fr2	R	R	R	R	R
46	40	Fr2	P	P	P	P	P
47	41	Fr2	G	G	G	G	G
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VL 6A10 мыши (SEQ ID NO:64)	Акцептор, учетн. № ABC66863 (SEQ ID NO:83)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
49	43	Fr2	S	S	S	S	S
50	44	Fr2	P	P	P	P	P
51	45	Fr2	K	R	R	R	R
52	46	Fr2	R	R	R	L	L
53	47	Fr2	L	L	L	L	L
54	48	Fr2	I	I	I	I	I
55	49	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
56	50	CDR-L2	L	K	L	L	L
57	51	CDR-L2	V	V	V	V	V
58	52	CDR-L2	S	S	S	S	S
59	53	CDR-L2	K	N	K	K	K
60	54	CDR-L2	L	R	L	L	L
61	55	CDR-L2	D	D	D	D	D
62	56	CDR-L2	S	S	S	S	S
63	57	Fr3	G	G	G	G	G
64	58	Fr3	V	V	V	V	V
65	59	Fr3	P	P	P	P	P
66	60	Fr3	D	D	D	D	D
67	61	Fr3	R	R	R	R	R
68	62	Fr3	F	F	F	F	F
69	63	Fr3	T	S	S	S	S
70	64	Fr3	G	G	G	G	G
71	65	Fr3	S	S	S	S	S
72	66	Fr3	G	G	G	G	G
73	67	Fr3	S	S	S	S	S
74	68	Fr3	G	G	G	G	G
75	69	Fr3	T	T	T	T	T

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VL 6A10 мыши (SEQ ID NO:64)	Акцептор, учетн. № ABC66863 (SEQ ID NO:83)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
76	70	Fr3	D	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F	F
78	72	Fr3	T	T	T	T	T
79	73	Fr3	L	L	L	L	L
80	74	Fr3	K	K	K	K	K
81	75	Fr3	I	I	I	I	I
82	76	Fr3	S	S	S	S	S
83	77	Fr3	R	R	R	R	R
84	78	Fr3	V	V	V	V	V
85	79	Fr3	E	E	E	E	E
86	80	Fr3	A	A	A	A	A
87	81	Fr3	E	E	E	E	E
88	82	Fr3	D	D	D	D	D
89	83	Fr3	L	V	V	V	V
90	84	Fr3	G	G	G	G	G
91	85	Fr3	V	V	V	V	V
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
94	88	Fr3	C	C	C	C	C
95	89	CDR-L3	W	M	W	W	W
96	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
97	91	CDR-L3	G	G	G	G	G
98	92	CDR-L3	T	T	T	T	T
99	93	CDR-L3	H	H	H	H	H
100	94	CDR-L3	F	R	F	F	F
101	95	CDR-L3	P	P	P	P	P
102	95A	CDR-L3	—	—	—	—	—
103	95B	CDR-L3	—	—	—	—	—

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VL 6A10 мыши (SEQ ID NO:64)	Акцептор, учетн. № ABC66863 (SEQ ID NO:83)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
104	95C	CDR-L3	—	—	—	—	—
105	95D	CDR-L3	—	—	—	—	—
106	95E	CDR-L3	—	—	—	—	—
107	95F	CDR-L3	—	—	—	—	—
108	96	CDR-L3	Y	L	Y	Y	Y
109	97	CDR-L3	T	T	T	T	T
110	98	Fr4	F	F	F	F	F
111	99	Fr4	G	G	G	G	G
112	100	Fr4	G	G	G	G	G
113	101	Fr4	G	G	G	G	G
114	102	Fr4	T	T	T	T	T
115	103	Fr4	K	K	K	K	K
116	104	Fr4	L	V	V	V	V
117	105	Fr4	E	E	E	E	E
118	106	Fr4	I	I	I	I	I
119	106A	Fr4	—	—	—	—	—
120	107	Fr4	K	K	K	K	K

Таблица 13

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 6A10 мыши (SEQ ID NO: 63)	Акцептор, учетн. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
--------------------	------------------------------	------------	---------------------------------	--	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 6A10 мыши (SEQ ID NO: 63)	Акцептор, учетн. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
1	1	Fr1	E	Q	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
6	6	Fr1	Q	E	E	E	E
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	S	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	G
17	17	Fr1	S	S	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	V	V	V	V
21	21	Fr1	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	T	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 6A10 мыши (SEQ ID NO: 63)	Акцептор, учетн. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
27	27	CDR-H1	L	Y	L	L	L
28	28	CDR-H1	N	T	N	N	N
29	29	CDR-H1	I	F	I	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	K	K	K
31	31	CDR-H1	D	G	D	D	D
32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	I	M	I	I	I
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	H
36	35A	CDR-H1	—	—			
37	35B	CDR-H1	—	—			
38	36	Fr2	W	W	W	W	W
39	37	Fr2	V	V	V	V	V
40	38	Fr2	K	R	R	R	R
41	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
42	40	Fr2	R	A	A	A	A
43	41	Fr2	P	P	P	P	P

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 6A10 мыши (SEQ ID NO: 63)	Акцептор, учтен. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
44	42	Fr2	E	G	G	G	G
45	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
46	44	Fr2	G	G	G	G	G
47	45	Fr2	L	L	L	L	L
48	46	Fr2	E	E	E	E	E
49	47	Fr2	W	W	W	W	W
50	48	Fr2	I	M	M	I	I
51	49	Fr2	G	G	G	G	G
52	50	CDR-H2	W	W	W	W	W
53	51	CDR-H2	I	I	I	I	I
54	52	CDR-H2	D	N	D	D	D
55	52A	CDR-H2	P	P	P	P	P
56	52B	CDR-H2	—	—			
57	52C	CDR-H2	—	—			
58	53	CDR-H2	E	N	E	E	E
59	54	CDR-H2	N	S	N	N	N
60	55	CDR-H2	D	G	D	D	D
61	56	CDR-	D	D	D	D	D

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 6A10 мыши (SEQ ID NO: 63)	Акцептор, учетн. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
		H2					
62	57	CDR-H2	T	T	T	T	T
63	58	CDR-H2	E	N	E	E	E
64	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y
65	60	CDR-H2	A	A	A	A	A
66	61	CDR-H2	P	Q	P	P	P
67	62	CDR-H2	K	K	K	K	K
68	63	CDR-H2	F	F	F	F	F
69	64	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q
70	65	CDR-H2	G	G	G	G	G
71	66	Fr3	R	R	R	R	R
72	67	Fr3	A	V	V	V	V
73	68	Fr3	T	T	T	T	T
74	69	Fr3	L	T	T	T	I
75	70	Fr3	T	T	T	T	T
76	71	Fr3	T	R	R	R	R
77	72	Fr3	D	D	D	D	D
78	73	Fr3	T	T	T	T	T
79	74	Fr3	S	S	S	S	S

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 6A10 мыши (SEQ ID NO: 63)	Акцептор, учетн. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
80	75	Fr3	S	I	I	I	I
81	76	Fr3	N	S	S	S	S
82	77	Fr3	T	T	T	T	T
83	78	Fr3	A	A	A	A	A
84	79	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
85	80	Fr3	L	M	M	M	L
86	81	Fr3	Q	E	E	E	E
87	82	Fr3	L	L	L	L	L
88	82A	Fr3	S	S	S	S	S
89	82B	Fr3	S	R	R	R	R
90	82C	Fr3	L	L	L	L	L
91	83	Fr3	T	R	R	R	R
92	84	Fr3	S	S	S	S	S
93	85	Fr3	E	D	D	D	D
94	86	Fr3	D	D	D	D	D
95	87	Fr3	T	T	T	T	T
96	88	Fr3	A	A	A	A	A
97	89	Fr3	V	V	V	V	V
98	90	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
99	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
100	92	Fr3	C	C	C	C	C
101	93	Fr3	T	A	A	A	A
102	94	Fr3	P	R	R	R	R
103	95	CDR-H3	L	L	L	L	L
104	96	CDR-	—	A	—	—	

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 6A10 мыши (SEQ ID NO: 63)	Акцептор, учетн. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
		H3					
105	97	CDR-H3	—	A	—	—	
106	98	CDR-H3	—	R	—	—	
107	99	CDR-H3	—	P	—	—	
108	100	CDR-H3	—	L	—	—	
109	100A	CDR-H3	—		—	—	
110	100B	CDR-H3	—		—	—	
111	100C	CDR-H3	—		—	—	
112	100D	CDR-H3	—		—	—	
113	100E	CDR-H3	—	—	—	—	
114	100F	CDR-H3	—	—	—	—	
115	100G	CDR-H3	—	—	—	—	
116	100H	CDR-H3	—	—	—	—	
s 117	100I	CDR-H3	—	—	—	—	

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 6A10 мыши (SEQ ID NO: 63)	Акцептор, учетн. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
118	100J	CDR-H3	-	-	-	-	
119	100K	CDR-H3	-	-	-	-	
120	101	CDR-H3	D	D	D	D	D
121	102	CDR-H3	Y	Y	Y	Y	Y
122	103	Fr4	W	W	W	W	W
123	104	Fr4	G	G	G	G	G
124	105	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
125	106	Fr4	G	G	G	G	G
126	107	Fr4	T	T	T	T	T
127	108	Fr4	S	L	L	L	L
128	109	Fr4	V	V	V	V	V
129	110	Fr4	T	T	T	T	T
130	111	Fr4	V	V	V	V	V
131	112	Fr4	S	S	S	S	S
132	113	Fr4	S	S	S	S	S

Таблица 14

Обратные мутации и другие мутации V_H, V_L для гуманизированного 6A10

Вариант V _H или V _L	Экзон акцепторной последовательности V _H или V _L	Изменения по сравнению с остатками акцепторного каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа)
hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	Акцептор, учетн. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	Отсутствуют
hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	Акцептор, учетн. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	H48
hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)	Акцептор, учетн. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	H16, H48, H69, H80
hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	Акцептор, учетн. № ABC66863 (SEQ ID NO:83)	Отсутствуют
hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	Акцептор, учетн. № ABC66863 (SEQ ID NO:83)	L46
hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)	Акцептор, учетн. № ABC66863 (SEQ ID NO:83)	L12, L17, L46

Таблица 15

Нумерация Кэбота остатков каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 6A10

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № ACR16112 (SEQ ID NO:81)	VH 6A10 мыши (SEQ ID NO: 63)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
H16	A	A	A	A	G
H48	M	I	M	I	I
H69	T	L	T	T	I
H80	M	L	M	M	L

5

Таблица 16

Нумерация Кэбота остатков каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 6A10

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № ABC66863 (SEQ ID NO:83)	VL 6A10 мыши (SEQ ID NO:64)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
L12	P	S	P	P	S
L17	Q	Q	Q	Q	E
L46	R	R	R	L	L

Таблица 17

Процент степени гуманизации тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител

5

6A10

Вариант V _H или V _L	% степени гуманизации
hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	83,7%
hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	82,7%
hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)	80,6%
hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	90,0%
hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	89,0%
hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)	87,0%

10

[0602] Положения, в которых остатки канонического класса Чотиа, верньерные остатки или остатки поверхности взаимодействия/остатки упаковки отличаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами для замены. Примеры остатков канонического класса Чотиа включают остатки H48 и H93 согласно Кэботу в таблицах 12 и 13. Примеры верньерных остатков включают остатки согласно Кэботу в таблицах 12 и 13. Примеры остатков поверхности

взаимодействия/остатков упаковки (VH+VL) включают остатки H35, H37, H39, H45, H47, H91, H93, H95, H103, L34, L36, L38, L44, L46, L87, L89, L91, L96 и L98 согласно Кэботу в таблицах 12 и 13.

[0603] Основания для выбора положений, указанных в таблице 12 в вариабельной области

5 легкой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

R46L: представляет собой остаток поверхности взаимодействия и, как правило, представляет собой L.

P12S: P редко встречается в каркасном участке в данном положении у людей, S встречается часто.

10 Q17E: Q редко встречается в каркасном участке в данном положении у людей, E встречается часто.

[0604] Вариабельные области легкой цепи:

[0605] Аминокислотная последовательность зрелой области VL m6A10 (SEQ ID NO: 64)

15 DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

[0606] Акцепторная VL 6A10, учетный №ABC66863 (SEQ ID NO:83)

20 DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTTHRPLTFGGGGTKVEIK

[0607] >3F4-VL, учетный № 1CR9_L (SEQ ID NO:30)

DVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLIWVFQRPQGQSPKRLIFLVSKRDS
GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPHTVGGGGTKLEIA

[0608] >IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:84)

25 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTWPLTFGGGGTKVEIK

[0609] >hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFGGGGTKVEIK

30 **[0610]** >hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFGGGGTKVEIK

[0611] >hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)

35 DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFGGGGTKVEIK

[0612] Основания для выбора положений, указанных в таблице 13 в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

M48I: представляет собой канонический/взаимодействующий с CDR остаток, который подвергли обратной мутации для сохранения взаимодействия с CDR.

5 A16G: Ala редко встречается в каркасном участке в данном положении у людей, Gly встречается часто.

T69I: Thr редко встречается в данном положении, Ile встречается часто.

M80L: Несмотря на то, что Met встречается часто, Leu встречается в данном положении наиболее часто.

10 **[0613]** Варибельные области тяжелой цепи:

[0614] Аминокислотная последовательность зрелой области VH m6A10 (SEQ ID NO: 63)
EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENDDTE
YAPKFQGRATLTDTSSNTAYLQLSSLTSEDNAVYYCTPLDYWGQGTSVTVSS

[0615] Акцепторная VH 6A10, учетный № ACR16112 (SEQ ID NO:84)

15 QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSG
DTNYAQKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLAARPLDYWGQGLTVT
VSS

[0616] >3F4-VH, учетный № 1CR9_H (SEQ ID NO: 27)

20 KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIYQWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGNSE
YAPRFQGKATMTADTLSTAYLQLSSLTSEDNAVYYCNADLHDYWGQGTTTLTVSS

[0617] >IGHV1-2*02 (SEQ ID NO:82)

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSG
GTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSRRGYDFWSGSPEDY
WGQGLTVTVSS

[0618] >hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)

30 QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGLNIKDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENDD
TEYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGLTVTVSS

[0619] >hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGLNIKDYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDPENDDT
EYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGLTVTVSS

35 **[0620]** >hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)

QVQLQESGAEVKKPGGSKVSVCKASGLNIKDYIHWVRQAPGGGLEWIGWIDPENDDT
EYAPKFQGRVTITRDTISISTAYLELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTLVTVSS

[0621] Пример 8. Дизайн гуманизированных антител 8A4

- 5 **[0622]** Исходной точкой для гуманизации моноклонального антитела 8A4 являлось антитело 8A4 мыши. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи зрелого 8A4 представлена в виде SEQ ID NO:91. Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи зрелого 8A4 представлена в виде SEQ ID NO:92. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи
- 10 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа представлены в виде SEQ ID NO:93-95, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи согласно Кэботу представлены в виде SEQ ID NO:96-98, соответственно. Везде применяют нумерацию Кэбота.
- 15 **[0623]** Выравнивание последовательностей вариабельной области 8A4 с консенсусными последовательностями вариабельных областей антитела из публикации Kabat, *et al.* (Kabat EA, Wu TT, Foeller C, Perry HM, Gottesman KS. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5th edition). Bethesda, MD: National Institutes of Health) свидетельствует, что вариабельная область тяжелой цепи (VH) 8A4 принадлежит к
- 20 подгруппе 2с VH мыши, которая соответствует подгруппе 1 VH человека. Вариабельная область легкой цепи каппа (VL) 8A4 принадлежит к подгруппе 2 Vk мыши, которая соответствует подгруппе 2 Vk человека.

- [0624]** CDR VH и VL 8A4 идентифицировали с применением правил Мартина для
- 25 идентификации CDR на основании последовательности (Martin ACR. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. In: Kontermann R and Dübel S (eds). *Antibody Engineering*. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.) Затем CDR относили к каноническим классам Чотиа с применением краткой характеристики ключевых остатков, представленной в таблице 3.5 публикации Martin:

30

CDR-H1 состоит из 10 аминокислот и подобен каноническому классу Чотиа 1.

CDR-H2 состоит из 17 аминокислот и подобен каноническому классу Чотиа 2.

CDR-H3 состоит из 3 аминокислот; классы для CDR-H3 отсутствуют.

35

CDR-L1 состоит из 16 аминокислот и подобен каноническому классу Чотиа 4.

CDR-L2 состоит из 7 аминокислот и представляет собой канонический класс Чотиа 1.

CDR-L3 состоит из 9 аминокислот и подобен каноническому классу Чотиа 1.

5 [0625] Остатки на поверхности взаимодействия между доменами V_k и V_h являются остатками, которые часто обнаруживают, за исключением того, что 93S в тяжелой цепи, как правило, представляет собой аланин; вследствие этого данный остаток анализируют в качестве мишени для обратной мутации. Аналогично, 36L в v_k, как правило, представляет собой Y или F, вследствие этого данный остаток также анализируют в отношении
10 обратных мутаций. Дополнительно, CRD3 легкой цепи содержит неспаренный остаток цистеина.

[0626] Проводили поиск среди белковых последовательностей в базе данных PDB [Deshpande N. et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33: D233-D237.] для обнаружения структур, которые обеспечат грубую структурную модель 8A4. Для структуры V_k использовали кристаллическую структуру fab антитела (код pdb 3JAU; SEQ ID NO:111) [Ye X, et al., (2016) *PLoS Pathog.*], поскольку она характеризовалась хорошим разрешением (4,8 Å) и общим подобием последовательности V_k 8A4 с сохранением тех же канонических структур для петель. Ту же структуру {код pdb 3JAU; SEQ ID NO:109 } также
15 использовали для структуры V_h, поскольку она характеризовалась высоким общим подобием последовательности и достаточно хорошим разрешением (4,8 Å). Помимо этого, CDR-H1 и H2 характеризуются теми же каноническими структурами, что и V_h 8A4. Для моделирования грубой структуры 8A4 использовали программное обеспечение Bioluminate. Данное программное обеспечение было лицензировано компанией
20 Schrodinger Inc.

[0627] Поиск в неизбыточной базе данных белковых последовательностей от NCBI позволил провести отбор подходящих каркасных участков человека, в которые переносили CDR мыши. Для V_k выбрали вариабельную область легкой цепи каппа человека с учетным № ABA26100 [SEQ ID NO:112 ; Rabquer, .B.J., et al, 2016; Differential variable gene usage between pneumococcal polysaccharide specific B cells isolated 5-10 days and 4-6 weeks post-vaccination. *Не опубликована*]. Данная последовательность характеризуется теми же каноническими классами для CDR-L1 и L2, что и VL 8A4 мыши, и является членом подгруппы 2 согласно Кэботу каппа человека. Для V_h выбрали
30 вариабельную область тяжелой цепи человека с учетным № ADU57742 [SEQ ID NO:110 ;

Lantto, J., et al, 2011 *J. Virol.* 85: 1820-1833]; данная последовательность характеризуется теми же каноническими классами, что и VH 8A4 мыши, и является членом подгруппы 1 согласно Кэботу тяжелой цепи человека.

5 [0628] Конструировали 3 варианта гуманизированной переменной области тяжелой цепи и 3 варианта гуманизированной переменной области легкой цепи, содержащие различные пермутации замен, hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2 и hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO: 113-115 соответственно) и hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2 и hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO: 116-118, соответственно) (таблицы 18 и 19). Иллюстративные дизайны гуманизированных VL
10 и VH с обратными мутациями и другими мутациями на основе отобранных каркасных областей человека представлены в таблицах 18 и 19, соответственно. Выделенные жирным шрифтом области в таблицах 18 и 19 отмечают CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа. «-» в столбцах в таблицах 18 и 19 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO:113-115 и SEQ ID NO: 116-118 содержат
15 обратные мутации и другие мутации, как представлено в таблице 20. Аминокислоты в положениях в hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2 и hu8A4-VH_v3 перечислены в таблице 21. Аминокислоты в положениях в hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2 и hu8A4-VL_v3 перечислены в таблице 22. Процент степени гуманизации для гуманизированных цепей VH hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2 и hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO: 113-115, соответственно) по
20 сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGHV1-2*02 (SEQ ID NO:82), а также для гуманизированных цепей VL hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2 и hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:116-118, соответственно) по сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:84) представлен в таблице 23.

25

Таблица 18

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VL 8A4 мыши (SEQ ID NO:92)	Акцептор, учетн. №ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu u8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu u8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	I	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	S	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	L	L	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	E	E
18	18	Fr1	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	R	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VL 8A4 мыши (SEQ ID NO:92)	Акцептор, учетн. №ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu u8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu u8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S	S
29	27B	CDR-L1	L	L	L	L	L
30	27C	CDR-L1	L	V	L	L	L
31	27D	CDR-L1	D	Y	D	D	D
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S	S
	27F	CDR-L1	-	-			
33	28	CDR-L1	D	D	D	D	D
34	29	CDR-L1	G	G	G	G	G
35	30	CDR-L1	K	S	K	K	K
36	31	CDR-L1	T	T	T	T	T
37	32	CDR-L1	Y	W	Y	Y	Y
38	33	CDR-L1	L	L	L	L	L
39	34	CDR-L1	N	N	N	N	N
40	35	Fr2	W	W	W	W	W
41	36	Fr2	L	F	F	F	L
42	37	Fr2	L	Q	Q	Q	Q
43	38	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
44	39	Fr2	R	R	R	R	R
45	40	Fr2	P	P	P	P	P
46	41	Fr2	G	G	G	G	G
47	42	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
48	43	Fr2	S	S	S	S	S
49	44	Fr2	P	P	P	P	P
50	45	Fr2	K	R	R	R	R
51	46	Fr2	R	R	R	R	R

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VL 8A4 мыши (SEQ ID NO:92)	Акцептор, учетн. №ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu u8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu u8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
52	47	Fr2	L	L	L	L	L
53	48	Fr2	I	I	I	I	I
54	49	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
55	50	CDR-L2	L	D	L	L	L
56	51	CDR-L2	V	V	V	V	V
57	52	CDR-L2	S	S	S	S	S
58	53	CDR-L2	K	T	K	K	K
59	54	CDR-L2	L	R	L	L	L
60	55	CDR-L2	D	D	D	D	D
61	56	CDR-L2	S	S	S	S	S
62	57	Fr3	G	G	G	G	G
63	58	Fr3	V	V	V	V	V
64	59	Fr3	P	P	P	P	P
65	60	Fr3	D	D	D	D	D
66	61	Fr3	R	R	R	R	R
67	62	Fr3	F	F	F	F	F
68	63	Fr3	T	S	S	S	S
69	64	Fr3	G	G	G	G	G
70	65	Fr3	S	S	S	S	S
71	66	Fr3	G	G	G	G	G
72	67	Fr3	S	S	S	S	S
73	68	Fr3	G	G	G	G	G
74	69	Fr3	T	T	T	T	T
75	70	Fr3	D	D	D	D	D
76	71	Fr3	F	F	F	F	F
77	72	Fr3	T	T	T	T	T

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VL 8A4 мыши (SEQ ID NO:92)	Акцептор, учетн. №ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu u8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu u8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
78	73	Fr3	L	L	L	L	L
79	74	Fr3	K	K	K	K	K
80	75	Fr3	I	I	I	I	I
81	76	Fr3	S	S	S	S	S
82	77	Fr3	R	R	R	R	R
83	78	Fr3	V	V	V	V	V
84	79	Fr3	E	E	E	E	E
85	80	Fr3	A	A	A	A	A
86	81	Fr3	E	E	E	E	E
87	82	Fr3	D	D	D	D	D
88	83	Fr3	L	V	V	V	V
89	84	Fr3	G	G	G	G	G
90	85	Fr3	V	V	V	V	V
91	86	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
92	87	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
93	88	Fr3	C	C	C	C	C
94	89	CDR-L3	W	M	W	W	W
95	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
96	91	CDR-L3	G	F	G	G	G
97	92	CDR-L3	T	I	T	T	T
98	93	CDR-L3	H	D	H	H	H
99	94	CDR-L3	F	W	F	F	F
100	95	CDR-L3	P	P	P	P	P
	95A	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95B	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95C	CDR-L3	-	-	-	-	-

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VL 8A4 мыши (SEQ ID NO:92)	Акцептор, учетн. №ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu u8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu u8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
	95D	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95E	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95F	CDR-L3	-	-	-	-	-
101	96	CDR-L3	C	H	C	C	C
102	97	CDR-L3	T	T	T	T	T
103	98	Fr4	F	F	F	F	F
104	99	Fr4	G	G	G	G	G
105	100	Fr4	G	Q	Q	Q	Q
106	101	Fr4	G	G	G	G	G
107	102	Fr4	T	T	T	T	T
108	103	Fr4	K	K	K	K	K
109	104	Fr4	L	L	L	L	L
110	105	Fr4	E	E	E	E	E
111	106	Fr4	I	I	I	I	I
	106A	Fr4	-	-	-	-	-
112	107	Fr4	K	K	K	K	K

Таблица 19

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 8A4 мыш (SEQ ID NO:91)	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
1	1	Fr1	E	Q	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V	V

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 8A4 мыш (SEQ ID NO:91)	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	V	V
13	13	Fr1	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	S	S	G	G
17	17	Fr1	L	S	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	V	V	L	L
21	21	Fr1	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	G	F	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	N	N	N
29	29	CDR-H1	I	F	I	I	I
30	30	CDR-H1	K	S	K	K	K

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 8A4 мыш (SEQ ID NO:91)	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
31	31	CDR-H1	D	S	D	D	D
32	32	CDR-H1	Y	N	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	P	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	I	V	I	I	I
35	35	CDR-H1	H	S	H	H	H
	35A	CDR-H1	-	-	-	-	-
	35B	CDR-H1	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	R	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	M	M	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	G	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I
52	52	CDR-H2	D	I	D	D	D
53	52A	CDR-H2	P	P	P	P	P
	52B	CDR-H2	-	-	-	-	-
	52C	CDR-H2	-	-	-	-	-
54	53	CDR-H2	E	F	E	E	E

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 8A4 мышь (SEQ ID NO:91)	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
55	54	CDR-H2	N	A	N	N	N
56	55	CDR-H2	G	Q	G	G	G
57	56	CDR-H2	D	K	D	D	D
58	57	CDR-H2	T	V	T	T	T
59	58	CDR-H2	V	L	V	V	V
60	59	CDR-H2	Y	G	Y	Y	Y
61	60	CDR-H2	D	A	D	D	D
62	61	CDR-H2	P	Q	P	P	P
63	62	CDR-H2	Q	R	Q	Q	Q
64	63	CDR-H2	F	V	F	F	F
65	64	CDR-H2	Q	R	Q	Q	Q
66	65	CDR-H2	D	D	D	D	D
67	66	Fr3	K	R	R	R	R
68	67	Fr3	A	I	I	I	A
69	68	Fr3	N	N	N	T	T
70	69	Fr3	I	I	I	I	I
71	70	Fr3	T	T	T	T	T
72	71	Fr3	A	A	A	A	A
73	72	Fr3	D	D	D	D	D
74	73	Fr3	T	T	T	T	T
75	74	Fr3	S	S	S	S	S
76	75	Fr3	S	T	T	T	T
77	76	Fr3	N	S	S	S	S
78	77	Fr3	T	T	T	T	T
79	78	Fr3	A	A	A	A	A
80	79	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
81	80	Fr3	L	M	M	M	M
82	81	Fr3	Q	E	E	E	E

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 8A4 мыш (SEQ ID NO:91)	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
83	82	Fr3	L	L	L	L	L
84	82A	Fr3	S	S	S	S	S
85	82B	Fr3	S	G	G	G	G
86	82C	Fr3	L	L	L	L	L
87	83	Fr3	T	R	R	R	R
88	84	Fr3	S	S	S	S	S
89	85	Fr3	E	D	D	D	E
90	86	Fr3	G	D	D	D	D
91	87	Fr3	T	T	T	T	T
92	88	Fr3	A	A	A	A	A
93	89	Fr3	V	V	V	V	V
94	90	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
95	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
96	92	Fr3	C	C	C	C	C
97	93	Fr3	S	A	S	S	A
98	94	Fr3	T	T	T	T	T
99	95	CDR-H3	L	G	L	L	L
	96	CDR-H3	-	Q	-	-	-
	97	CDR-H3	-	Q	-	-	-
	98	CDR-H3	-	L	-	-	-
	99	CDR-H3	-	Y	-	-	-
	100	CDR-H3	-	S	-	-	-
	100A	CDR-H3	-	L	-	-	-
	100B	CDR-H3	-		-	-	-
	100C	CDR-H3	-		-	-	-
	100D	CDR-H3	-		-	-	-
	100E	CDR-H3	-		-	-	-
	100F	CDR-H3	-		-	-	-

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 8A4 мышь (SEQ ID NO:91)	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
	100G	CDR-H3	-		-	-	-
	100H	CDR-H3	-		-	-	-
	100I	CDR-H3	-		-	-	-
	100J	CDR-H3	-		-	-	-
	100K	CDR-H3	-		-	-	-
100	101	CDR-H3	D	H	D	D	D
101	102	CDR-H3	F	Y	F	F	F
102	103	Fr4	W	W	W	W	W
103	104	Fr4	G	G	G	G	G
104	105	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
105	106	Fr4	G	G	G	G	G
106	107	Fr4	T	T	T	T	T
107	108	Fr4	T	L	L	L	L
108	109	Fr4	L	V	V	V	V
109	110	Fr4	T	T	T	T	T
110	111	Fr4	V	V	V	V	V
111	112	Fr4	S	S	S	S	S
112	113	Fr4	S	S	S	S	S

Таблица 20

Обратные мутации и другие мутации V_H, V_L для гуманизированного 8A4

Вариант V_H или V_L	Экзон акцепторной последовательности V_H или V_L	Изменения по сравнению с остатками акцепторного каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа)
hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	H93
hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	H12, H16, H20, H68, H93
hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	H12, H16, H20, H48, H67, H68, H85
hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	Акцептор, учетн. № ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Отсутствуют
hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	Акцептор, учетн. № ABA26100 (SEQ ID NO:112)	L17
hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)	Акцептор, учетн. № ABA26100 (SEQ ID NO:112)	L2, L17, L36

Таблица 21

Нумерация Кэбота остатков каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 8A4

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	VH 8A4 мыши (SEQ ID NO: 91)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
H12	K	V	K	V	V
H16	S	A	S	G	G

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	VH 8A4 мыши (SEQ ID NO: 91)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
H20	V	L	V	L	L
H48	M	I	M	M	I
H67	I	A	I	I	A
H68	N	N	N	T	T
H85	D	E	D	D	E
H93	A	S	S	S	A

[0629] Таблица 22

Нумерация Кэбота остатков каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 8A4

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № ABA26100 (SEQ ID NO:112)	VL 8A4 мыши (SEQ ID NO:92)	hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
L2	I	V	I	I	V
L17	Q	Q	Q	E	E
L36	F	L	F	F	L

Таблица 23

Процент степени гуманизации тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител 8A4

Вариант V _H или V _L	% степени гуманизации
hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	75,3%
hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	75,3%
hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)	75,3%
hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	89%
hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	88%
hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)	88%

[0630] Положения, в которых остатки канонического класса Чотиа, верньерные остатки или остатки поверхности взаимодействия/остатки упаковки отличаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами для замены. Примеры остатков канонического класса Чотиа включают остатки H24, H26, H29, H34, H54, H55, H71, H94, L2, L25, L27B, L27C, L29, L33, L34, L71, L90, L94, L95 и L97 согласно Кэботу в таблицах 18 и 19 и у. Примеры верньерных остатков включают остатки H2, H27, H28, H29, H30, H47, H48, H49, H67, H69, H71, H73, H78, H93, H94, H103, L2, L4, L35, L36, L46, L47, L48, L49, L64, L66, L68, L69, L71 и L98 согласно Кэботу в таблицах 18 и 19. Примеры остатков поверхности взаимодействия/остатков упаковки (VH+VL) включают остатки H35, H37, H39, H45, H47, H91, H93, H95, H103, L34, L36, L38, L44, L46, L87, L89, L91, L96 и L98 согласно Кэботу в таблицах 18 и 19.

[0631] Основания для выбора положений, указанных в таблице 18 в вариабельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

I2V представляет собой обратную мутацию канонического и верньерного остатка.

Q17E представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку Q редко встречается в каркасном участке в данном положении у людей, а E встречается наиболее часто.

F36L представляет собой обратную мутацию остатка поверхности взаимодействия и верньерного остатка.

[0632] Вариабельные области легкой цепи:

[0633] зрелая область VL 8A4 мыши (SEQ ID NO: 92)

DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNLWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHTFPCTFGGGTKLEIK

[0634] 3JAUVL (SEQ ID NO: 111)

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVYYCYQGSHVPYTFGGGGTKLEIK

5 [0635] ABA26100 (SEQ ID NO: 112)

DVMTSSSVTGASSCRSSSVYSDGSTWNWRGSRRYDVSTRDSGVDRSGSGSGTDTKSRV
ADVGVYYCMDWHTGGTKK

[0636] IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 84)

10 DIVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGTKLEIK

[0637] hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO: 116)

DIVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
15 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGTKLEIK

[0638] hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO: 117)

DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGTKLEIK
20

[0639] hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO: 118)

DVVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGTKLEIK

25 [0640] Основания для выбора положений, указанных в таблице 19 в вариабельной области
тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

K12V представляет собой обратную мутацию и мутацию на основе частоты,
поскольку V встречается часто в данном положении в каркасном участке у людей.

S16G представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку G встречается
30 наиболее часто в данном положении.

V20L представляет собой обратную мутацию и мутацию на основе частоты,
поскольку L встречается наиболее часто в данном положении.

M48I представляет собой обратную мутацию верньерного остатка.

I67A представляет собой обратную мутацию верньерного остатка.

N68T представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку T встречается наиболее часто в данном положении.

D85E представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку E встречается наиболее часто в данном положении в каркасном участке у людей. A93S представляет собой обратную мутацию в hu8A4-VHv1 и hu8A4VH-v2 верньерного остатка и остатка поверхности взаимодействия для сохранения упаковки CDR. В hu8A4VH-v3 положение согласно Кэботу представляет собой A, поскольку A встречается наиболее часто в данном положении, а S встречается редко.

10 **[0641]** Вариабельные области тяжелой цепи:

[0642] Зрелая область VH 8A4 мыши (SEQ ID NO: 91)

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
VYDPQFQDKANITADTSSNTAYLQLSSLTSEGTAVYYCSTLDFWGQGTTTLTVSS

15 **[0643]** 3JAU VH (SEQ ID NO: 109)
EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGKIDPANGNTK
YDPKFQDKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCANSNYWFDYWGQGTTTLTVS
S

20 **[0644]** ADU57742 (SEQ ID NO: 110)
QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSNPVSWVRQAPGQGLEWMGGIIPFAQKV
LGAQRVRDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCATGQQLYSLHYWGQGTTLVTV
SS

25 **[0645]** IGHV1-2*02 (SEQ ID NO:82)
QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGD
TVYDPQFQDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGQGTTLVTVSS

30 **[0646]** hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO: 113)
QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGD
TVYDPQFQDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGQGTTLVTVSS

[0647] hu8A4-VH_v2: (SEQ ID NO: 114)

QVQLQQSGAEVVKPGGSKVLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGGGLEWMGWIDPENGDT
TVYDPQFQDRITITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGGQGLTVTVSS

5 [0648] hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO: 115)

QVQLQQSGAEVVKPGGSKVLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGGGLEWIGWIDPENGD
TVYDPQFQDRITITADTSTSTAYMELSGLRSEDVAVYYCATLDFWGGQGLTVTVSS

[0649] **Пример 9.** Дизайн гуманизированных антител 7G6

10

[0650] Исходной точкой для гуманизации моноклонального антитела 7G6 являлось антитело 7G6 мыши. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи зрелого 7G6 представлена в виде SEQ ID NO:119. Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи зрелого 7G6 представлена в виде
15 SEQ ID NO:120. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно сводному определению Кэбота/Чотиа представлены в виде SEQ ID NO:121-123, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи согласно Кэботу представлены в виде SEQ ID NO:124-126, соответственно. Везде применяют нумерацию Кэбота.

20

[0651] Выравнивание последовательностей вариабельной области 7G6 с консенсусными последовательностями вариабельных областей антитела из публикации Kabat, *et al.* [Kabat EA, Wu TT, Perry H, Gottesman K, Foeller C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242] свидетельствует, что вариабельная область тяжелой цепи (VH) 7G6 принадлежит к подгруппе 2с VH мыши, которая
25 соответствует подгруппе 1 VH человека. Вариабельная область легкой цепи (VL) каппа 7G6 принадлежит к подгруппе 2 Vk мыши, которая соответствует подгруппе 2 Vk человека.

30

[0652] CDR VH и VL 7G6 идентифицировали с применением правил Мартина для идентификации CDR на основании последовательности [Martin AC, Thornton JM. (1996) Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modeling and application to antibodies. J Mol Biol. 263:800-15.]. CDR относили к каноническим классам Чотиа с применением краткой характеристики ключевых остатков, представленной в таблице 3.5 публикации Martin:

35

CDR-H1 состоит из 7 аминокислот и подобен каноническому классу Чотиа 1.

CDR-H2 состоит из 6 аминокислот и подобен каноническому классу Чотиа 2.

CDR-H3 состоит из 3 аминокислот; классы для CDR-H3 отсутствуют.

CDR-L1 состоит из 16 аминокислот и подобен каноническому классу Чотиа 4.

CDR-L2 состоит из 7 аминокислот и представляет собой канонический класс Чотиа

5 1.

CDR-L3 состоит из 9 аминокислот и подобен каноническому классу Чотиа 1.

[0653] Основания для гуманизации переменного домена иммуноглобулина 7G6

10 Антитело мыши Prothena-7G6 (далее именуемое просто 7G6) гуманизировали, исходя из матрицы акцепторного антитела человека, обозначенного как 3U0T [La Porte, S.L., et al., (2012) J.Mol.Biol. 421: 525-536] в банке данных белков RCSB. Данную матрицу антитела идентифицировали в результате антитело-специфичного поиска последовательности по гомологии, ограниченного остатками переменного домена VL (1-110) и VH (1-114). При
15 поиске по гомологии применяли программное обеспечение BioLuminate, версия 3.1, выпускная версия 2018-1 компании Schrodinger. Данное программное обеспечение сравнивает последовательность целевого антитела (7G6) с организованной Schrodinger базой данных последовательностей переменного домена человека и мыши, для которых были опубликованы кристаллические структуры белка высокого качества.

20 **[0654] Выбор матрицы антитела человека**

Антитело-матрицу 3U0T [3U0T_VH SEQ ID NO: 127; 3U0T_VL SEQ ID NO:138], которое характеризовалось разрешением 2,5 ангстрем, идентифицировали в группе подобных антител человека, которые характеризовались идентичностью или подобием аминокислотной последовательности более 80% с 7G6 в соответствующих переменных
25 доменах VH и VL, а также имели кристаллическую структуру с разрешением ниже 3,0 ангстрем. Некоторые другие антитела в данной группе включали (по коду pdb): 4YVG, 6BOG, 4KY1, 5TZT, 4HCR и 5K9O. 3U0T было выбрано благодаря высокой гомологии последовательности с 7G6 в положениях поверхности взаимодействия VH/VL, пронумерованных согласно Кэботу. VH [35,37,39,45,47,89,91,93] и VL[44,45,46,47,48,49].
30 Среди данных остатков поверхности взаимодействия 7G6 и 3U0T различаются только в VL-45 (R по сравнению с K) и VH-93 (T по сравнению с A). Общая гомология переменного домена в определенных согласно Чотиа каркасных участках представлена в таблице 24. (В каркасном участке Чотиа, в отличие от Кэбота, CDR-H2 оканчивается в положении 58).

Таблица 24

Гомология последовательности между варьируемыми доменами 7G6 и 3U0T

Домен	Общее количество остатков каркасного участка	Идентичные	Подобные	Отличающиеся
VL	81	7	6	5
VH	89	62	13	14

[0655] Подобные аминокислоты группируют по полярности и заряду, ароматичности, гидрофобности или объему и форме, например: (I,L,M,V), (S,T), (F,Y), (E,Q,D,N). VL характеризуется идентичностью или подобием в каркасном участке более 93%, и VH характеризуется идентичностью или подобием в каркасном участке более 84%. Дальнейшая проверка позволила выявить высокую степень гомологии для очень длинного CDR-1 легкой цепи. Из 20 остатков 17 являются идентичными, а 2 являются различными: (D,Y) в VL-7D и (G,A) в VL-29. Вследствие этого кристаллическая структура 3U0T должна обеспечить превосходный образец для формы CDR L-1.

[0656] Иллюстративными различиями между 7G6 и 3U0T являются:

[0657] Остаток 89-W в VL 7G6. Данный остаток находится в пределах поверхности взаимодействия VL/VH, где он заменяет F из 3U0T. Исходное структурное моделирование с предсказанием антител с помощью BioLuminate позволило получить структуры, в которых W89 содержит один из двух ротамеров боковой цепи. $\chi_1 = 0$ или 90° градусов. В ротамере $\chi_1 = 0$ W89 размещается перпендикулярно к поверхности взаимодействия VL/VH. В данном положении W89 способствует образованию дна антиген-связывающего кармана и обладает потенциалом для образования вандерваальсового контакта как с CDR-H3 (в особенности, Leu-95 в VH), так и с несколькими из консервативных остатков, которые иным способом образуют поверхность взаимодействия VL/VH. В ротамере $\chi_1 = 180^\circ$ боковая цепь триптофана ориентируется параллельно поверхности взаимодействия VH/VL; в результате она не будет осуществлять контакт с CDR-H3, но будет осуществлять вандерваальсовые контакты с несколькими другими консервативными остатками, которые образуют поверхность взаимодействия VH/VL. В иллюстративных гуманизированных вариантах VL 7G6 используют ориентацию Trp $\chi_1 = 0$. В настоящем изобретении также предусмотрена мутация других каркасных аминокислот, которые осуществляют вандерваальсовые контакты с W89 в ориентации $\chi_1 = 90^\circ$, но не $\chi_1 = 0$.

[0528] В высокой степени консервативный цистин в положении 92H согласно Кэботу является практически повсеместным в укладках иммуноглобулинов, поскольку он образует дисульфидный мостик с в равной степени консервативным Cys 22-Hvy, который предшествует CDR H1. Тем не менее, в последовательности 7G6 данный дисульфидный мостик VH разрушается в результате мутации 94 Cys на 94 Ser. Исходное структурное моделирование с помощью BioLuminate продемонстрировало, что каркасные участки характеризуются небольшой деформацией, которая образуется в результате утраты дисульфидного мостика. Тем не менее, разрушенная дисульфидная связь придает большую подвижность пептидному остову в Ser-94-hvy. В иллюстративных гуманизированных вариантах 7G6 CDR-H3 VH начинается в положении Ser-92 вместо Ser-94.

[0528] Даже при данном удлинении на два остатка CDR H3 антитела 7G6 содержит только 6 аминокислотных остатков: STSLDF. Сокращение CDR H3 открывает антигенсвязывающий карман, а также создает пространство для иллюстративного ротамера W89 ch1=0 домена VL легкой цепи, чтобы он упаковывался напротив тяжелой цепи.

[0658] Горячими точками для мутаций акцепторной последовательности человека 3U0T являются таковые, в которых каркасный остаток отличается от последовательности мыши, И такой каркасный остаток также характеризуется наилучшим потенциалом для образования вандерваальсовых контактов с ротамерами легкой цепи W89. Данные положения включают: 50W тяжелой цепи в начале CDR2 и иллюстративные обратные мутации в легкой цепи 36 (F на L), 37 (Q на L), 45 (R на K) и 100 (Q на G). В варианте реализации в тяжелой цепи используют остаток мыши 50W, поскольку он является частью CDR-H2.

[0659] Конструировали 2 варианта гуманизированной варибельной области тяжелой цепи и 8 вариантов гуманизированной варибельной области легкой цепи, содержащие различные пермутации замен, hu7G6-VH_v1 и hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO: 139-140, соответственно) и hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7 и hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO: 141-148, соответственно) (таблицы 25 и 26). Иллюстративные дизайны гуманизированных VL и VH с обратными мутациями и другими мутациями на основе отобранных каркасных областей человека представлены в таблицах 25 и 26, соответственно. Выделенные жирным шрифтом области в таблицах 25 и 26 отмечают CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа. «-» в столбцах в таблицах 25 и 26 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO:139-140 и SEQ ID NO: 141-148 содержат обратные

[illegible]

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	<u>VL 7G6 мыши (SEQ ID NO: 120)</u>	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
120	107	Fr4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Таблица 26

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	<u>VH 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)</u>	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
1	1	Fr1	E	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	<u>VH 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)</u>	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
12	12	Fr1	V	K	V	V
13	13	Fr1	R	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A
17	17	Fr1	L	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	V	L	L
21	21	Fr1	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	Y	F	F
28	28	CDR-H1	N	Y	N	N
29	29	CDR-H1	I	T	I	I
30	30	CDR-H1	K	E	K	K
31	31	CDR-H1	D	A	D	D
32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	I	I	I	I
35	35	CDR-H1	H	H	H	H

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	<u>VH 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)</u>	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
36	35A	CDR-H1	-	-	-	-
37	35B	CDR-H1	-	-	-	-
38	36	Fr2	W	W	W	W
39	37	Fr2	V	V	V	V
40	38	Fr2	K	R	R	K
41	39	Fr2	Q	Q	Q	Q
42	40	Fr2	R	A	A	A
43	41	Fr2	P	P	P	P
44	42	Fr2	E	G	G	G
45	43	Fr2	Q	Q	Q	Q
46	44	Fr2	G	G	G	G
47	45	Fr2	L	L	L	L
48	46	Fr2	E	E	E	E
49	47	Fr2	W	W	W	W
50	48	Fr2	I	M	M	M
51	49	Fr2	G	G	G	G
52	50	CDR-H2	W	R	W	W
53	51	CDR-H2	I	I	I	I

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR VH 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO: 137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO: 139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO: 140)
54	52	CDR-H2 D	D	D	D
55	52A	CDR-H2 P	P	P	P
56	52B	CDR-H2			
57	52C	CDR-H2			
58	53	CDR-H2 E	A	E	E
59	54	CDR-H2 N	T	N	N
60	55	CDR-H2 G	G	G	G
61	56	CDR-H2 E	N	E	E
62	57	CDR-H2 T	T	T	T
63	58	CDR-H2 V	K	V	V
64	59	CDR-H2 Y	Y	Y	Y
65	60	CDR-H2 D	A	D	D
66	61	CDR-H2 P	P	P	P
67	62	CDR-H2 K	R	K	K
68	63	CDR-H2 F	L	F	F
69	64	CDR-H2 Q	Q	Q	Q
70	65	CDR-H2 G	D	G	G
71	66	Fr3 K	R	R	R
72	67	Fr3 A	V	V	V
73	68	Fr3 S	T	T	T
74	69	Fr3 I	M	I	I
75	70	Fr3 T	T	T	T

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	<u>VH 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)</u>	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
76	71	Fr3	S	R	R	R
77	72	Fr3	D	D	D	D
78	73	Fr3	T	T	T	T
79	74	Fr3	S	S	S	S
80	75	Fr3	S	T	T	T
81	76	Fr3	N	S	N	N
82	77	Fr3	T	T	T	T
83	78	Fr3	A	V	A	A
84	79	Fr3	Y	Y	Y	Y
85	80	Fr3	L	M	L	L
86	81	Fr3	Q	E	Q	Q
87	82	Fr3	L	L	L	L
88	82A	Fr3	R	S	S	S
89	82B	Fr3	S	S	S	S
90	82C	Fr3	L	L	L	L
91	83	Fr3	T	R	R	R
92	84	Fr3	S	S	S	S
93	85	Fr3	E	E	E	E
94	86	Fr3	D	D	D	D
95	87	Fr3	T	T	T	T
96	88	Fr3	A	A	A	A
97	89	Fr3	V	V	V	V

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR VH 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO: 137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO: 139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO: 140)
98	90	Fr3	Y	Y	Y
99	91	Fr3	Y	Y	Y
100	92	Fr3	S	C	S
101	93	Fr3	T	A	T
102	94	Fr3	S	S	S
103	95	CDR-H3	L	L	L
104	96	CDR-H3	-	Y	-
105	97	CDR-H3	-	S	-
106	98	CDR-H3	-	L	-
107	99	CDR-H3	-	P	-
108	100	CDR-H3	-	-	-
109	100A	CDR-H3	-	-	-
110	100B	CDR-H3	-	-	-
111	100C	CDR-H3	-	-	-
112	100D	CDR-H3	-	-	-
113	100E	CDR-H3	-	-	-
114	100F	CDR-H3	-	-	-
115	100G	CDR-H3	-	-	-
116	100H	CDR-H3	-	-	-
s 117	100I	CDR-H3	-	-	-
118	100J	CDR-H3	-	-	-

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	<u>VH 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)</u>	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
119	100K	CDR-H3	-	-	-	-
120	101	CDR-H3	D	V	D	D
121	102	CDR-H3	F	Y	F	F
122	103	Fr4	W	W	W	W
123	104	Fr4	G	G	G	G
124	105	Fr4	Q	Q	Q	Q
125	106	Fr4	G	G	G	G
126	107	Fr4	T	T	T	T
127	108	Fr4	S	T	T	T
128	109	Fr4	V	V	V	V
129	110	Fr4	T	T	T	T
130	111	Fr4	V	V	V	V
131	112	Fr4	S	S	S	S
132	113	Fr4	S	S	S	S

Таблица 27

Обратные мутации и другие мутации V_H, V_L для гуманизированного 7G6

Вариант V_H или V_L	Экзон акцепторной последовательности V_H или V_L	Изменения по сравнению с остатками акцепторного каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа)
hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93
hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	H12, H20, H38, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93
hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L103
hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L37, L103
hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L36, L103
hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L36, L37, L103
hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L45, L103
hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L36, L37, L45, L103
hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L100, L103
hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L36, L37, L100, L103

Таблица 28

Нумерация Кэбота остатков каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 7G6

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	VH 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
H12	K	V	V	V
H20	V	L	L	L
H38	R	K	R	K
H69	M	I	I	I
H76	S	N	N	N
H78	V	A	A	A
H80	M	L	L	L
H81	E	Q	Q	Q
H92	C	S	S	S
H93	A	T	T	T

5

Таблица 29

Нумерация Кэбота остатков каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 7G6

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	VL 7G6 мыши (SEQ ID NO:119)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
L12	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L36	F	L	F	F	L	L	F	L	F	L
L37	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	VL 7G6 мыши (SEQ ID NO:119)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
L45	R	K	R	R	R	R	K	K	R	R
L100	Q	G	Q	Q	Q	Q	Q	Q	G	G
L103	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Таблица 30

Процент степени гуманизации тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител 7G6

Вариант V _H или V _L	% степени гуманизации
hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	77,9%
hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)	76,8%
hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	89,0%
hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	88,0%
hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	88,0%
hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	87,0%
hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	88,0%
hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	86,0%
hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	89,0%
hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)	87,0%

5

[0660] Положения, в которых остатки канонического класса Чотиа, верньерные остатки или остатки поверхности взаимодействия/остатки упаковки отличаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами для замены. Примеры канонических остатков класса Чотиа включают остаток L2 согласно Кэботу в таблицах 25 и 26. Примеры верньерных остатков включают остатки H66, H67, H69 и L49 согласно Кэботу в таблицах 25 и 26. Примеры остатков поверхности взаимодействия/остатков упаковки (VH+VL) включают остатки H35, H37, H39, H45, H47,

10

H93, H95, H97, H103, L34, L36, L39, L44, L45, L46, L87, L89, L91, L96 и L98 согласно Кэботу в таблицах 25 и 26.

[0661] Основания для выбора положений, указанных в таблице 25 в вариабельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

- 5 P12S представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку Р редко встречается в каркасном участке в данном положении у людей.
- F36L представляет собой обратную мутацию остатка поверхности взаимодействия.
- Q37L: На основании структурной модели Leu потенциально может вступать в конфликт с W89 (VL) и VH CDR-H3 95Leu, вследствие этого исследуют обратную
- 10 мутацию.
- R45K представляет собой обратную мутацию остатка поверхности взаимодействия.
- Q100G: Q потенциально может вступать в конфликт с W89 (VL), вследствие этого исследуют обратную мутацию Q100G.
- R103K представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку R редко
- 15 встречается в каркасном участке в данном положении у людей.

[0662] Вариабельные области легкой цепи:

[0663] VL MAT 7G6 мыши (SEQ ID NO: 120)

DVVMQTQTPLTSLVTIGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLLIYLVSKLD

20 SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIKR

[0664] Акцепторная VL человека, PDB 3UOT_VL (SEQ ID NO: 138)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDAKTYLNWFQQRPGQSPRRLLIYQISRLDP

GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHYPVLFGQGTRLEIKR

25

[0665] последовательность зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 84)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLLIYKVSNRD

SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTWPLTFGGGGTKVEIK

30 **[0666]** hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO: 141)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLLIYLVSKLD

SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGQGGTKLEIKR

[0667] hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO: 142)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWFLQRPQGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

[0668] hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO: 143)

5 DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLQRPQGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

[0669] hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO: 144)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLVSKLD
10 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

[0670] hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO: 145)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWFQRPQGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR
15

[0671] hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO: 146)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

20 **[0672]** hu7G6-VL_v7: (SEQ ID NO: 147)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWFQRPQGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGGGGTKLEIKR

[0673] hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO: 148)

25 DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGGGGTKLEIKR

[0674] Основания для выбора положений, указанных в таблице 26 в вариабельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

30 K12V представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку V обнаруживается более часто, чем K, в данном положении.
V20L представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку L обнаруживается более часто, чем V, в данном положении.

R38K: структурная модель предсказывает, что Arg может вступать в конфликт с Tyr91 и потенциально может являться стабилизирующим остатком, но Lys также будет исследован в качестве обратной мутации.

M69I представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку I обнаруживается более часто, чем M, в данном положении в каркасном участке у людей и располагается поблизости от CDR-H2.

S76N представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку N обнаруживается более часто, чем S, в данном положении в каркасном участке у людей.

V78A представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку A обнаруживается более часто, чем V, в данном положении в каркасном участке у людей.

M80L представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку L обнаруживается более часто, чем M, в данном положении в каркасном участке у людей.

E81Q представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку Q обнаруживается более часто, чем E, в данном положении в каркасном участке у людей.

C92S: В последовательности мыши присутствует Ser. В норме Cys в данном положении образует дисульфидную связь, но у мышей данная связь разрушается, что потенциально предполагает подвижность. Для того, чтобы сохранить подвижность петли CDR, сохраняют Ser в данном положении путем проведения обратной мутации C92S.

A93T представляет собой обратную мутацию остатка поверхности взаимодействия

Вариабельные области тяжелой цепи:

[0675] VH MAT 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGET
VYDPKFQGKASITSDTSSNTAYLQLRSLTSED TAVYYSTSLDFWGQGTSVTVSS

[0676] Акцепторная VH человека DB 3UOT_VH (SEQ ID NO: 137)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYYTEAYYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPATGN
TKYAPRLQDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASLYSLPVYWGQGTTVTVS

S

[0677] последовательность зародышевой линии человека IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 149)

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGE
TVYDPKFQGKASITSDTSSNTAYLQLRSLTSEDТАVYYSTSLDFWGQGTSTVTVSS

5

[0678] hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO: 139)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGE
TVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDТАVYYSTSLDFWGQGTTVTVSS

10 [0679] hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO: 140)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQAPGQGLEWMGWIDPENGE
TVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDТАVYYSTSLDFWGQGTTVTVSS

[0680] **Пример 10 Картирование эпитопа 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 и 3D6**

15

[0681] Перекрывающиеся биотинилированные пептиды, охватывающие длину изоформы 4R0N тау (383 аминокислот), присоединяли к лункам планшета для ELISA, сенсibilизированного стрептавидином. Планшет промывали, блокировали и наносили антитела 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 и 3D6 мыши. После промывки на планшет наносили конъюгированное с пероксидазой хрена антитело против иммуноглобулинов мыши, после чего лунки обрабатывали OPD (о-фенилендиамин дигидрохлорид) для развития окрашивания. Считывание на планшетах проводили при поглощении 450 нм, фоновое поглощение в лунках, не содержащих первичное антитело, использовали в качестве пустой пробы для вычитания. Для антител 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 и 3D6 было обнаружено

20 конъюгированное с пероксидазой хрена антитело против иммуноглобулинов мыши, после чего лунки обрабатывали OPD (о-фенилендиамин дигидрохлорид) для развития окрашивания. Считывание на планшетах проводили при поглощении 450 нм, фоновое поглощение в лунках, не содержащих первичное антитело, использовали в качестве пустой пробы для вычитания. Для антител 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 и 3D6 было обнаружено

25 положительное связывание с пептидами, охватывающими аминокислоты 199-213 и 262-276 SEQ ID NO:3. Данные пептиды соответствуют аминокислотам 257-271 и 315-329 в полномразмерном тау-белке человека 4R2N.

Перечень последовательностей

30 [0682] P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDТDAGLKESPLQTPTEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDE
AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAK
TPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSP
35 SSAKSRLQTAPVPMPLKNNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD

NIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKI
GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSVSST
GSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL

5 **[0683]** P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEAE EAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKG
ADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPG
TPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKSKIGSTEN
10 LKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGS
LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
AKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL

[0684] P10636-6 (тау человека 4RON) (SEQ ID NO:3)

15 MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAE EAGIGDTPSLE
DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIP
AKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPK
SPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS
KDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQ
20 SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSV
SSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL

[0685] P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
25 EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAA AQPHTEIPEGTTAE EAGIGDTPSLEDE
AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAK
TPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSP
SSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLG
NIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK
30 TDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL

[0686] P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEAE EAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKG
35 ADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPG

TPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNV KSKIGSTEN
LKHQPGGGKVQIVYK PVDLSK VTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FDKDRVQSKI
GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNV SST
GSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL

5

[0687] P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLK AEEAGIGDTPSLE
DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP GQK GQANATRIP
AKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPK
10 SPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNV KSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYK PVDLSK VTSKCGS
LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
AKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNV SSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL

15 [0688] SEQ ID NO:7; аминокислотная последовательность VH 5G8 мыши без сигнального пептида

EVQLQQSGAELVRSGASVRLSCTASGFNIKDYMHVVRQRPEQGLEWIGWIDPEN GDT
VYAPKFQ GKATMTSDTSSNTAYLHLSSLTSED TAVYYCSPLDFWGQGTTLT VSS

20 [0689] SEQ ID NO:8; аминокислотная последовательность VL 5G8 мыши без сигнального пептида

DVVM TQTPLT LSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKIRRVEAEDLG VYYCWQGTLPYTFGGG TKLEIKR

25 [0690] SEQ ID NO:9: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность VH 5G8 мыши, с сигнальным пептидом

ATGAAATGCAGCTGGGTCATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTATAGGAATCAATTCA
GAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAGGTCAGGGGCCTCAGTCAG
GTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGGACTACTATATGCACTGGGTGAG
30 GCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATTGATCCTGAGAATGGTG
ATACTGTATATGCCCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATGACTTCAGACACATCCT
CCAACACAGCCTACCTGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAAGACACTGCCGTCTATT
ACTGTAGCCCCCTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0691] SEQ ID NO:10: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность VL 5G8 мыши, с сигнальным пептидом:

ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTTTCTGTAGTACTCTGGATTCGGGAAACCAAC
5 GGTGATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCTGGTTACCATTTGGACAACCA
GCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATAT
TTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTG
TCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGA
TTTCACACTGAAAATCCGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTG
10 GCAAGGTACACTTTTTCCGTACACGTTCTGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAC
GG

[0692] SEQ ID NO:11: HCDR-1 5G8 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа
GFNIKDYMH

15 [0693] SEQ ID NO:12: HCDR-2 5G8 мыши согласно Кэботу
WIDPENGDTVYAPKFQG

[0694] SEQ ID NO:13: HCDR-3 5G8 мыши согласно Кэботу
LDF
20

[0695] SEQ ID NO:14: LCDR-1 5G8 мыши согласно Кэботу
KSSQSL LDSDGKTYLN

[0696] SEQ ID NO:15: LCDR-2 5G8 мыши согласно Кэботу
25 LVSKLDS

[0697] SEQ ID NO:16: LCDR-3 5G8 мыши согласно Кэботу
WQGTLPYT

30 [0698] SEQ ID NO:17 HCDR-1 5G8 мыши согласно Кэботу
DYMH

[0699] SEQ ID NO:18 HCDR-1 5G8 мыши согласно Чотиа
GFNIKDY

[0700] SEQ ID NO:19 HCDR-1 5G8 мыши согласно контактному определению
KDYYMH

[0701] SEQ ID NO:20 HCDR-2 5G8 мыши согласно Чотиа

5 DPENGD

[0702] SEQ ID NO:21 HCDR-2 5G8 мыши согласно AbM

WIDPENGDTV

10 [0703] SEQ ID NO:22 HCDR-2 5G8 мыши согласно контактному определению
WIGWIDPENGDTV

[0704] SEQ ID NO:23 HCDR-3 5G8 мыши согласно контактному определению

SPLD

15

[0705] SEQ ID NO:24 LCDR-1 5G8 мыши согласно контактному определению

KTYLNWL

[0706] SEQ ID NO:25 LCDR-2 5G8 мыши согласно контактному определению

20 RLIYLVSKLD

[0707] SEQ ID NO:26 LCDR-3 5G8 мыши согласно контактному определению

WQGTLPY

25 [0708] SEQ ID NO:27 >3F4-VH

KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIYQWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGNSE
YAPRFQGKATMTADTLSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCNADLHDYWGQGTTTLTVSS

[0709] SEQ ID NO:28 >aDabi-Fab2b-VH

30 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYMHVVRQAPGQGLEWMGETNPRNG
GTTYNEKFKGKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTIGTSGYDYFDYWGQGTL
VTVSS

[0710] SEQ ID NO:29 >IGHV1-46

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGS
TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR

[0711] SEQ ID NO:30 >3F4-VL

5 DVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLIWVFQRPQGSPKRLIFLVSKRDS
GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPHTVGGGKLEIA

[0712] SEQ ID NO: 31 >aDabi-Fab2b-VL

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSDGNIYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSRYFS
10 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHVPYTFGGGKLEIK

[0713] SEQ ID NO: 32 >IGKV2-29

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVSSRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLP
15

[0714] SEQ ID NO:33 > hu5G8-VH_v1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENG
DTVYAPKFQGKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTILDFWGQGTLLTVSS

20 [0715] SEQ ID NO:34 > hu5G8-VH_v2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWIGWIDPENGD
TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

[0716] SEQ ID NO:35 hu5G8-VH_v3

25 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWIGWIDPENGD
TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

[0717] SEQ ID NO:36 > hu5G8-VH_v4

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
30 TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

[0718] SEQ ID NO:37 > hu5G8-VH_v5

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
TVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

[0719] SEQ ID NO:38 > hu5G8-VH_v6

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCAASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWIDPENG
TVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSED AVYYCSPLDFWGQGTLVTVSS

5 [0720] SEQ ID NO:39 > hu5G8-VH_v7

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENG
DTVYAPKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED AVYYCARLDFWGQGTLVTVSS

[0721] SEQ ID NO:40 > hu5G8-VH_v8

10 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWIDPENG
TVYAPKFQGRVTMTSDTSTSTVYMESSLRSED AVYYCSPLDFWGQGTLVTVSS

[0722] SEQ ID NO:41 > hu5G8-VL_v1

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWYLQKPGQSPKLLIYLVSKLD
15 SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGGKLEIK

[0723] SEQ ID NO:42 > hu5G8-VL_v2

DVVMQTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQKPGQSPKRLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGGKLEIK
20

[0724] SEQ ID NO:43 > hu5G8-VL_v3

DVVMQTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQKPGQSPKRLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGGKLEIK

25 [0725] SEQ ID NO:44 > hu5G8-VL_v4

DVVMQTQSPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQKPGQSPKRLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGGKLEIK

[0726] SEQ ID NO:45 > hu5G8-VL_v5

30 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGGKLEIK

[0727] SEQ ID NO:46 > hu5G8-VL_v6

DVVMQTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQKPGQSPQRLLIYLVSKLD
35 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGGKLEIK

[0728] SEQ ID NO:47 > аминокислотная последовательность VH 5G8 мышцы с сигнальным пептидом

MKCSWVIFFLMAVVIGINSEVQLQQSGAELVRSGASVRLSCTASGFNIKDYMHVVRQ
5 RPEQGLEWIGWIDPENGDTVYAPKFQGKATMTSDTSSNTAYLHLSSLTSEDNAVYYCSP
LDFWGQGTTTLTVSS

[0729] SEQ ID NO:48 > аминокислотная последовательность VL 5G8 мышцы с сигнальным пептидом

10 MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLN
WLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKIRRVEAEDLGVYYCWQGTL
FPYTFGGGKLEIK

[0730] SEQ ID NO: 49 >: аминокислотная последовательность m6A10VH:

15 MKCSWVIFFLMAVVIGINSEVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYIHWVKQR
PEQGLEWIGWIDPENDDTEYAPKFQGRATLTDTSSNTAYLQLSSLTSEDNAVYYCTPL
DYWGQGTSTVTVSS

[0731] SEQ ID NO: 50 : аминокислотная последовательность m6A10VL:

20 MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLN
WLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTH
FPYTFGGGKLEIKR

[0732] SEQ ID NO: 51 : аминокислотная последовательность m7G6VH:

25 MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQ
RPEQGLEWIGWIDPENGETVYDPKFQGKASITSDTSSNTAYLQLRSLTSEDNAVYYSTSL
DFWGQGTSTVTVSS

[0733] SEQ ID NO: 52 аминокислотная последовательность m7G6VL:

30 MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLN
WLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTH
FPYTFGGGKLEIKR

[0734] SEQ ID NO: 53 аминокислотная последовательность m8A4VH:

MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQ
RPEQGLEWIGWIDPENGDTVYDPQFQDKANITADTSSNTAYLQLSSLTSEGTAVYYCST
LDFWGQGTTTLTVSS

5 [0735] SEQ ID NO: 54 аминокислотная последовательность m8A4VL:

MMSPAQFLFLLVLWNRETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLN
WLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTH
FPCTFGGGGTKLEIKR

10 [0736] SEQ ID NO:55; аминокислотная последовательность VH 3D6 мыши:

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYILHWVRQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
VYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSS

[0737] SEQ ID NO:56; HCDR1 3D6 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа:

15 GFNIKDYILH

[0738] SEQ ID NO:57; HCDR2 3D6 мыши согласно Кэботу:

WIDPENGDTVYDPKFQG

20 [0739] SEQ ID NO:58; HCDR3 3D6 мыши согласно Кэботу:

LDF

[0740] SEQ ID NO:59; аминокислотная последовательность VL 3D6 мыши:

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLD
25 SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKR

[0741] SEQ ID NO:60; LCDR1 3D6 мыши согласно Кэботу:

KSSQSLLDSDGKTYLN

30 [0742] SEQ ID NO: 61 ; LCDR2 3D6 мыши согласно Кэботу:

LVSKLDS

[0743] SEQ ID NO:62 ; LCDR3 3D6 мыши согласно Кэботу:

WQGTHFPYT

[0744] SEQ ID NO: 63 аминокислотная последовательность зрелой области m6A10VH:
EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYYIHVVKQRPEQGLEWIGWIDPENDDTE
YAPKFQGRATLTDTSSNTAYLQLSSLTSEDTA VYYCTPLDYWGQGTSVTVSS

5 [0745] SEQ ID NO: 64 : аминокислотная последовательность зрелой области m6A10VL:
DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCWQGTHFPYTFGGGKLEIK

[0746] SEQ ID NO: 65 CDR-H1 6A10 мыши согласно сводному определению
10 Кэбота/Чотиа:
GLNIKDYYIH

[0747] SEQ ID NO:66 CDR-H2 6A10 мыши согласно Кэботу:
WIDPENDDTEYAPKFQG
15

[0748] SEQ ID NO: 67 CDR-H3 6A10 мыши согласно Кэботу:
LDY

[0749] SEQ ID NO: 68 CDR-L1 6A10 мыши согласно Кэботу:
20 KSSQSLLDSDGKTYLN

[0750] SEQ ID NO: 69 CDR-L2 6A10 мыши согласно Кэботу:
LVSKLDS

25 [0751] SEQ ID NO: 70 CDR-L3 6A10 мыши согласно Кэботу:
WQGTHFPYT

[0752] SEQ ID NO: 71 CDR-H1 6A10 мыши согласно Кэботу:
DYYIH
30

[0753] SEQ ID NO: 72 CDR-H1 6A10 мыши согласно Чотиа:
GLNIKDY

[0754] SEQ ID NO: 73 CDR-H1 6A10 мыши согласно контактному определению:
35 KDYYIH

[0755] SEQ ID NO:74 CDR-H2 6A10 мыши согласно Чотиа:

DPENDD

5 [0756] SEQ ID NO:75 CDR-H2 6A10 мыши согласно AbM:

WIDPENDDTE

[0757] SEQ ID NO:76 CDR-H2 6A10 мыши согласно контактному определению:

WIGWIDPENDDTE

10

[0758] SEQ ID NO:77 CDR-H3 6A10 мыши согласно контактному определению:

TPLD

[0759] SEQ ID NO: 78 CDR-L1 6A10 мыши согласно контактному определению:

15 KTYLNWL

[0760] SEQ ID NO: 79 CDR-L2 6A10 мыши согласно контактному определению:

RLIYLVSKLD

20 [0761] SEQ ID NO: 80 CDR-L3 6A10 мыши согласно контактному определению:

WQGTHFPY

[0762] SEQ ID NO: 81 Акцепторная VH 6A10, учетный № ACR16112:

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSG

25 DTNYAQKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLAARPLDYWGQGTSLVTVSS

[0763] SEQ ID NO: 82 последовательность зародышевой линии человека IGHV1-2*02:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSG

30 GTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSRRGYDFWWSGSPEDYWGQGTSLVTVSS

[0764] SEQ ID NO: 83 Акцепторная VL 6A10, учетный №ABC66863:

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD

35 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHRPLTFGGGGTKVEIK

[0765] SEQ ID NO: 84 последовательность зародышевой линии человека IGKV2-30*02:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPLTFGGGGTKVEIK

5

[0766] SEQ ID NO: 85 hu6A10-VH_v1:

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGLNIKDYYIHWVRQAPGGGLEWMGWIDPENDD
TEYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTLVTVSS

10 [0767] SEQ ID NO: 86 hu6A10-VH_v2:

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGLNIKDYYIHWVRQAPGGGLEWIGWIDPENDDT
EYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTLVTVSS

[0768] SEQ ID NO: 87 hu6A10-VH_v3:

15 QVQLQESGAEVKKPGGSVKVSKASGLNIKDYYIHWVRQAPGGGLEWIGWIDPENDDT
EYAPKFQGRVTITRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTLVTVSS

[0769] SEQ ID NO: 88 hu6A10-VL_v1:

20 DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKVEIK

[0770] SEQ ID NO: 89 hu6A10-VL_v2:

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKVEIK

25

[0771] SEQ ID NO: 90 hu6A10-VL_v3:

DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKVEIK

30 [0772] SEQ ID NO: 91 зрелая область VH 8A4 мышцы:

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
VYDPQFQDKANITADTSSNTAYLQLSSLTSEGTAVYYCSTLDFWGQGTTTLTVSS

[0773] SEQ ID NO: 92 зрелая область VL 8A4 мышцы:

DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPCTFGGGGTKLEIK

[0774] SEQ ID NO: 93 CDR-H1 8A4 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа:

5 GFNIKDYIYH

[0775] SEQ ID NO:94 CDR-H2 8A4 мыши согласно Кэботу:

WIDPENGDTVYDPQFQD

10 [0776] SEQ ID NO: 95 CDR-H3 8A4 мыши согласно Кэботу:

LDF

[0777] SEQ ID NO: 96 CDR-L1 8A4 мыши согласно Кэботу:

KSSQSLLDSDGKTYLN

15

[0778] SEQ ID NO: 97 CDR-L2 8A4 мыши согласно Кэботу:

LVSKLDS

[0779] SEQ ID NO: 98 CDR-L3 8A4 мыши согласно Кэботу:

20 WQGTHFPCT

[0780] SEQ ID NO: 99 CDR-H1 8A4 мыши согласно Кэботу:

DYYIYH

[0781] SEQ ID NO: 100 CDR-H1 8A4 мыши согласно Чотиа:

25 GFNIKDY

[0782] SEQ ID NO: 101 CDR-H1 8A4 мыши согласно контактному определению:

KDYYIYH

30 [0783] SEQ ID NO:102 CDR-H2 8A4 мыши согласно Чотиа:

DPENGD

[0784] SEQ ID NO:103 CDR-H2 8A4 мыши согласно AbM:

WIDPENGDTV

35

[0785] SEQ ID NO:104 CDR-H2 8A4 мыши согласно контактному определению:
WIGWIDPENGDTV

[0786] SEQ ID NO:105 CDR-H3 8A4 мыши согласно контактному определению:

5 STLD

[0787] SEQ ID NO: 106 CDR-L1 8A4 мыши согласно контактному определению:
KTYLNWL

10 **[0788]** SEQ ID NO: 107 CDR-L2 8A4 мыши согласно контактному определению:
RLIYLVSKLD

[0789] SEQ ID NO: 108 CDR-L3 8A4 мыши согласно контактному определению:
WQGTHFPC

15

[0790] SEQ ID NO: 109 3JAU VH:
EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGKIDPANGNTK
YDPKFQDKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTA VYYCANSNYWFDFDYWGQGTTLT V S

20

[0791] SEQ ID NO: 110 ADU57742:
QVQLQQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSNPVSWVRQAPGQGLEWMGGIIPFAQKV
LGAQRVRDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTA VYYCATGQQLYSLHYWGQGT L V T V S S

25

[0792] SEQ ID NO: 111 3JAU VL:
DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK V S N R F
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDTG V V Y C Y Q G S H V P Y T F G G G T K L E I K

30 **[0793]** SEQ ID NO: 112 ABA26100:
DVMTSSSVTGASSCRSSSVYSDGSTWNWRGSRRYDVSTRDSGVDRSGSGSGTDTKSRV
ADVGVYYC MDWHTGGTKK

[0794] SEQ ID NO: 113 hu8A4-VH_v1:

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT
TVYDPQFQDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGGGTLTVSS

[0795] SEQ ID NO: 114 hu8A4-VH_v2:

5 QVQLQQSGAEVVKPGGSKVLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT
TVYDPQFQDRITITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGGGTLTVSS

[0796] SEQ ID NO: 115 hu8A4-VH_v3:

10 QVQLQQSGAEVVKPGGSKVLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDPENGD
VYDPQFQDRATITADTSTSTAYMELSGLRSEDVAVYYCATLDFWGGGTLTVSS

[0797] SEQ ID NO: 116 hu8A4-VL_v1:

15 DIVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGGGTKLEIK

[0798] SEQ ID NO: 117 hu8A4-VL_v2:

DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGGGTKLEIK

20 [0799] SEQ ID NO: 118 hu8A4-VL_v3:

DVVMQTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGGGTKLEIK

[0800] SEQ ID NO: 119 VH MAT 7G6 мыши:

25 EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGET
VYDPKFQGKASITSDTSSNTAYLQLRSLTSEDVAVYYSTSLDFWGGGTSVTVSS

[0801] SEQ ID NO: 120 VL MAT 7G6 мыши:

30 DVVMQTQTPLTSLVTIGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIKR

[0802] SEQ ID NO: 121 CDR-H1 7G6 мыши согласно сводному определению

Кэбота/Чотиа:

GFNIKDYIHW

[0803] SEQ ID NO:122 CDR-H2 7G6 мыши согласно Кэботу:
WIDPENGETVYDPKFQG

[0804] SEQ ID NO: 123 CDR-H3 7G6 мыши согласно Кэботу:

5 LDF

[0805] SEQ ID NO: 124 CDR-L1 7G6 мыши согласно Кэботу:
KSTQSLLDSDGKTYLN

10 **[0806]** SEQ ID NO: 125 CDR-L2 7G6 мыши согласно Кэботу:
LVSKLDS

[0807] SEQ ID NO: 126 CDR-L3 7G6 мыши согласно Кэботу:
WQGTHFPYT

15

[0808] SEQ ID NO: 127 CDR-H1 7G6 мыши согласно Кэботу:
DYYIH

[0809] SEQ ID NO: 128 CDR-H1 7G6 мыши согласно Чотиа:

20 GFNIKDY

[0810] SEQ ID NO: 129 CDR-H1 7G6 мыши согласно контактному определению:
KDYYIH

25 **[0811]** SEQ ID NO:130 CDR-H2 7G6 мыши согласно Чотиа:
DPENGE

[0812] SEQ ID NO:131 CDR-H2 7G6 мыши согласно AbM:
WIDPENGETV

30

[0813] SEQ ID NO:132 CDR-H2 7G6 мыши согласно контактному определению:
WIGWIDPENGETV

[0814] SEQ ID NO:133 CDR-H3 7G6 мыши согласно контактному определению:

35 TSLD

[0815] SEQ ID NO: 134 CDR-L1 7G6 мыши согласно контактному определению:
KTYLNWL

5 [0816] SEQ ID NO: 135 CDR-L2 7G6 мыши согласно контактному определению:
RLIYLVSKLD

[0817] SEQ ID NO: 136 CDR-L3 7G6 мыши согласно контактному определению:
WQGTHFPY

10 [0818] SEQ ID NO: 137 Акцепторная VH человека DB 3U0T_VH:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYYTEAYYIHWRQAPGQGLEWMGRIDPATGN
TKYAPRLQDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDТАVYYCASLYSLPVYWQGTTVTVS
S

15 [0819] SEQ ID NO: 138 Акцепторная VL человека PDB 3U0T_VL:
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDAKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYQISRLDP
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHYPVLFGQGTRLEIKR

20 [0820] SEQ ID NO: 139 hu7G6-VH_v1:
QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGE
TVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDТАVYYSTSLDFWGQGTTVTVSS

[0821] SEQ ID NO: 140 hu7G6-VH_v2:
25 QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQAPGQGLEWMGWIDPENGE
TVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDТАVYYSTSLDFWGQGTTVTVSS

[0822] SEQ ID NO: 141 hu7G6-VL_v1:
DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIKR

30 [0823] SEQ ID NO: 142 hu7G6-VL_v2:
DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWFLQRPQGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIKR

35 [0824] SEQ ID NO: 143 hu7G6-VL_v3:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGQGTKLEIKR

[0825] SEQ ID NO: 144 hu7G6-VL_v4:

5 DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGQGTKLEIKR

[0826] SEQ ID NO: 145 hu7G6-VL_v5:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLFQQRPGQSPKRRLIYLVSKLD
10 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGQGTKLEIKR

[0827] SEQ ID NO: 146 hu7G6-VL_v6:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQQRPGQSPKRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGQGTKLEIKR
15

[0828] SEQ ID NO: 147 hu7G6-VL_v7:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLFQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIKR

20 **[0829]** SEQ ID NO: 148 hu7G6-VL_v8:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIKR

25 **[0830]** SEQ ID NO: 149 последовательность зародышевой линии человека IGHV1-69-2*01

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGET
VYDPKFQGKASITSDTSSNTAYLQLRSLTSED TAVYYSTSLDFWGQGTSTVTVSS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело, которое конкурирует с антителом 5G8 за связывание с тау человека.
2. Антитело по п. 1, которое связывается с тем же эпитопом на тау человека, что и 5G8.
3. Антитело по п. 1, которое содержит три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 5G8, причем указанное 5G8 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 7, и вариабельной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO:8.
4. Антитело по п. 3, отличающееся тем, что указанные три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 11, 12 и 13), и указанные три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 14, 15 и 16).
5. Антитело по п. 1, которое представляет собой 5G8 или химерную, венированную или гуманизированную форму указанного антитела.
6. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$.
7. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что указанная вариабельная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$.
8. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что каждая из указанных вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$.
9. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.
10. Антитело по п. 5, которое представляет собой гуманизированное или химерное антитело 5G8, которое специфично связывается с тау человека, причем указанное 5G8 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:7 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:8.
11. Гуманизированное антитело по п. 10, содержащее гуманизированную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR тяжелой цепи

5G8, и гуманизованную зрелую вариабельную область легкой цепи, которая содержит три CDR легкой цепи 5G8.

12. Гуманизованное антитело по п. 11, отличающееся тем, что указанные CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения.

13. Гуманизованное антитело по п. 12, отличающееся тем, что указанная гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 5G8 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 11-13), и указанная гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 5G8 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 14-16).

14. Гуманизованное антитело по п. 12, отличающееся тем, что указанная гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 5G8 согласно Кэботу (SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:13), и указанная гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 5G8 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 14-16).

15. Гуманизованное антитело по п. 12, отличающееся тем, что указанная гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 5G8 согласно Чотиа (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:13), и указанная гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 5G8 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 14-16).

16. Гуманизованное антитело по п. 12, отличающееся тем, что указанная гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 5G8 согласно AbM (SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:13)), и указанная гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 5G8 согласно AbM (SEQ ID NO: 14-16).

17. Гуманизованное антитело по п. 12, отличающееся тем, что указанная гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 5G8 согласно контактному определению (SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO: 23), и указанная гуманизованная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 5G8 согласно контактному определению (SEQ ID NO:24-26).

18. Гуманизованное антитело по любому из пп. 10-17, содержащее гуманизованную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO:33-40, и гуманизированную зрелую вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 41-46.

19. Гуманизированное антитело по п. 18, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H48 занимает I, H71 занимает S, H93 занимает S, и H94 занимает P.

20. Гуманизированное антитело по п. 19, при условии, что положения H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает I, S, S и P, соответственно.

21. Гуманизированное антитело по п. 18, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H48 занимает I, H71 занимает S, H93 занимает S, и H94 занимает P.

22. Гуманизированное антитело по п. 21, при условии, что положения H1, H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает E, I, S, S и P, соответственно.

23. Гуманизированное антитело по п. 18, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H46 занимает D, H48 занимает I, H71 занимает S, H93 занимает S, и H94 занимает P.

24. Гуманизированное антитело по п. 23, при условии, что положения H1, H46, H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает E, D, I, S, S и P, соответственно.

25. Гуманизированное антитело по п. 18, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H11 занимает L, H12 занимает V, H19 занимает R, H20 занимает L, H46 занимает D, H48 занимает I, H71 занимает S, H76 занимает N, H80 занимает L, H93 занимает S, и H94 занимает P.

26. Гуманизированное антитело по п. 25, при условии, что положения H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93 и H94 в области VH занимает E, L, V, R, L, D, I, S, N, L, S и P, соответственно.

27. Гуманизированное антитело по п. 18, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H66 занимает R, H67 занимает V, и H78 занимает V.

28. Гуманизированное антитело по п. 27, при условии, что положения H66, H67 и H78 в области VH занимает R, V и V, соответственно.

29. Гуманизированное антитело по п. 18, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1

занимает Q или E, H11 занимает V или L, H12 занимает K или V, H19 занимает K или R, H20 занимает V или L, H23 занимает K или A, H46 занимает E или D, H48 занимает M или I, H66 занимает K или R, H67 занимает A или V, H71 занимает R или S, H76 занимает S или N, H78 занимает A или V, H80 занимает M или L, H93 занимает T, S или A, и H94 занимает I, P или R.

30. Гуманизированное антитело по п. 29, при условии, что положения H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает I, S, S и P, соответственно.

31. Гуманизированное антитело по п. 29, при условии, что положения H1, H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает E, I, S, S и P, соответственно.

32. Гуманизированное антитело по п. 29, при условии, что положения H1, H46, H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает E, D, I, S, S и P, соответственно.

33. Гуманизированное антитело по п. 29, при условии, что положения H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93 и H94 в области VH занимает E, L, V, R, L, D, I, S, N, L, S и P, соответственно.

34. Гуманизированное антитело по п. 29, при условии, что положения H1, H11, H12, H19, H20, H23, H46, H48, H71, H76, H80, H93 и H94 в области VH занимает E, L, V, R, L, A, D, I, S, N, L, S и P, соответственно.

35. Гуманизированное антитело по п. 29, при условии, что положения H66, H67, H78, H93 и H94 в области VH занимает R, V, V, A и R, соответственно.

36. Гуманизированное антитело по п. 29, при условии, что положения H1, H46, H48, H66, H67, H71, H78, H93 и H94 в области VH занимает E, D, I, R, V, S, V, S и P, соответственно.

37. Гуманизированное антитело по п. 18, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает V, L7 занимает S, L17 занимает E, L36 занимает L, L45 занимает Q, L46 занимает R, и L70 занимает D.

38. Гуманизированное антитело по п. 37, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает V, L36 занимает L, и L46 занимает R.

39. Гуманизированное антитело по п. 38, при условии, что положения L2, L36 и L46 в области VL занимает V, L и R, соответственно.

40. Гуманизированное антитело по п. 37, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает V, L36 занимает L, L46 занимает R, и L70 занимает D.

41. Гуманизированное антитело по п. 40, при условии, что положения L2, L36, L46 и L70 в области VL занимает V, L, R и D, соответственно.

42. Гуманизированное антитело по п. 37, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L45 занимает Q, и L70 занимает D.

43. Гуманизированное антитело по п. 42, при условии, что положения L45 и L70 в области VL занимает Q и D, соответственно.

44. Гуманизированное антитело по п. 37, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает I или V, L7 занимает T или S, L17 занимает Q или E, L36 занимает Y или L, L45 занимает K или Q, L46 занимает L или R, и L70 занимает G или D.

45. Гуманизированное антитело по п. 44, при условии, что положения L2, L36, L46 в области VL занимает V, L и R, соответственно.

46. Гуманизированное антитело по п. 44, при условии, что положения L2, L36, L46 и L70 в области VL занимает V, L, R и D, соответственно.

47. Гуманизированное антитело по п. 44, при условии, что положения L2, L7, L17, L36, L46, L70 в области VL занимает V, S, E, L, R и D, соответственно.

48. Гуманизированное антитело по п. 44, при условии, что положения L45 и L70 в области VL занимает Q и D, соответственно.

49. Гуманизированное антитело по п. 44, при условии, что положения L2, L36, L45, L46, L70 в области VL занимает V, L, Q, R и D, соответственно.

50. Гуманизированное антитело по п. 18, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 33-40, и зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 41-46.

51. Гуманизированное антитело по п. 50, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 33-40, и зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 41-46.

52. Гуманизированное антитело по п. 51, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 33-40, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 41-46.

последовательность SEQ ID NO:40, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41.

96. Гуманизированное антитело по п. 52, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42.

97. Гуманизированное антитело по п. 52, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43.

98. Гуманизированное антитело по п. 52, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44.

99. Гуманизированное антитело по п. 52, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45.

100. Гуманизированное антитело по п. 52, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46.

101. Антитело по п. 1, содержащее три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 6A10, причем указанное 6A10 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется переменной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 63, и переменной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO:64.

102. Антитело по п. 101, отличающееся тем, что указанные три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 65, 66 и 67), и указанные три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 68, 69 и 70).

103. Антитело по п. 1, которое представляет собой 6A10 или химерную, венеризованную или гуманизированную форму указанного антитела.

104. Антитело по п. 103, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$.

105. Антитело по п. 103, отличающееся тем, что указанная переменная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$.

106. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что каждая из указанных переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$.

107. Антитело по любому из пп. 1, 2 и 101-106, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

108. Антитело по п. 103, которое представляет собой гуманизированное или химерное антитело 6A10, которое специфично связывается с тау человека, причем указанное 6A10 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:63 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:64.

109. Гуманизированное антитело по п. 108, содержащее гуманизированную зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR тяжелой цепи 6A10, и гуманизированную зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR легкой цепи 6A10.

110. Гуманизированное антитело по п. 109, отличающееся тем, что указанные CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения.

111. Гуманизированное антитело по п. 110, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 65-67), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 68-70).

112. Гуманизированное антитело по п. 110, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно Кэботу (SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 68-70).

113. Гуманизированное антитело по п. 110, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно Чотиа (SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74 и SEQ ID NO:67), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 68-70).

114. Гуманизированное антитело по п. 110, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно AbM (SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:75 и SEQ ID NO:67), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно AbM (SEQ ID NO: 68-70).

115. Гуманизированное антитело по п. 110, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно контактному определению (SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO: 77)), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно контактному определению (SEQ ID NO:78-80).

116. Гуманизированное антитело по любому из пп. 108-115, содержащее гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO:85-87, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 88-90.

117. Гуманизированное антитело по п. 116, отличающееся тем, что положение H48 в области VH занимает I.

118. Гуманизированное антитело по п. 116, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H16 занимает A или G, H48 занимает M или I, H69 занимает T или I, и H80 занимает M или L.

119. Гуманизированное антитело по п. 118, при условии, что положение H48 в области VH занимает I.

120. Гуманизированное антитело по п. 118, при условии, что положения H16, H48, H69, и H80 в области VH занимает G, I, I и L, соответственно.

121. Гуманизированное антитело по п. 116, отличающееся тем, что L46 в области VL занимает L.

122. Гуманизированное антитело по п. 116, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает Р или S, L17 занимает Q или E, и L46 занимает R или L.

123. Гуманизированное антитело по п. 122, при условии, что положение L46 в области VL занимает L.

124. Гуманизированное антитело по п. 122, при условии, что положения L12, L17 и L46 в области VL занимает S, E и L, соответственно.

125. Гуманизированное антитело по п. 116, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 85-87, и зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 88-90.

126. Гуманизированное антитело по п. 125, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 85-87, и зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 88-90.

127. Гуманизированное антитело по п. 126, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85-87, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 88-90.

128. Гуманизированное антитело по п. 127, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.

129. Гуманизированное антитело по п. 127, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89.

130. Гуманизированное антитело по п. 127, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90.

131. Гуманизированное антитело по п. 127, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:86, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.

132. Гуманизированное антитело по п. 127, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89.

133. Гуманизированное антитело по п. 127, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90.

134. Гуманизированное антитело по п. 127, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.

135. Гуманизированное антитело по п. 127, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89.

136. Гуманизированное антитело по п. 127, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90.

137. Антитело по п. 1, содержащее три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 8A4, причем указанное 8A4 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется переменной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 91, и переменной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO:92.

138. Антитело по п. 137, отличающееся тем, что указанные три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 93, 94 и 95), и указанные три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 96, 97 и 98).

139. Антитело по п. 1, которое представляет собой 8A4 или химерную, венированную или гуманизированную форму указанного антитела.

140. Антитело по п. 139, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$.

141. Антитело по п. 139, отличающееся тем, что указанная переменная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$.

142. Антитело по п. 139, отличающееся тем, что каждая из указанных переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$.

143. Антитело по любому из пп. 1, 2 и 137-142, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

144. Антитело по п. 139, которое представляет собой гуманизированное или химерное антитело 8A4, которое специфично связывается с тау человека, причем указанное 8A4 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:91 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:92.

145. Гуманизированное антитело по п. 144, содержащее гуманизированную зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR тяжелой цепи 8A4, и гуманизированную зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR легкой цепи 8A4.

146. Гуманизированное антитело по п. 145, отличающееся тем, что указанные CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения.

147. Гуманизированное антитело по п. 146, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 8A4 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 93-95), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 8A4 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 96-98).

148. Гуманизированное антитело по п. 146, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 8A4 согласно Кэботу (SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 8A4 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 96-98).

149. Гуманизированное антитело по п. 146, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три

CDR тяжелой цепи 8A4 согласно Чотиа (SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102 и SEQ ID NO:95), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 8A4 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 96-98).

150. Гуманизированное антитело по п. 146, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 8A4 согласно AbM (SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:103 и SEQ ID NO:95), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 8A4 согласно AbM (SEQ ID NO: 96-98).

151. Гуманизированное антитело по п. 146, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 8A4 согласно контактному определению (SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:104 и SEQ ID NO: 105), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 8A4 согласно контактному определению (SEQ ID NO:106-108).

152. Гуманизированное антитело по любому из пп. 144-151, содержащее гуманизированную зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO:113-115, и гуманизированную зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 116-118.

153. Гуманизированное антитело по п. 152, отличающееся тем, что положение H93 в области VH занимает S.

154. Гуманизированное антитело по п. 152, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает V, H16 занимает G, H20 занимает L, и H68 занимает T.

155. Гуманизированное антитело по п. 154, при условии, что положения H12, H16, H20 и H68 в области VH занимает V, G, L и T, соответственно.

156. Гуманизированное антитело по п. 152, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает K или V, H16 занимает S или G, H20 занимает V или L, H48 занимает M или I, H67 занимает A или I, H68 занимает N или T, H85 занимает D или E, и H93 занимает S или A.

157. Гуманизированное антитело по п. 156, при условии, что положение H93 в области VH занимает S.

158. Гуманизированное антитело по п. 156, при условии, что положения H12, H16, H20, H68 и H93 в области VH занимает V, G, L, T и S, соответственно.

159. Гуманизированное антитело по п. 156, при условии, что положения H12, H16, H20, H48, H67, H68 и H85 в области VH занимает V, G, L, I, A, T и E, соответственно.

160. Гуманизированное антитело по п. 152, отличающееся тем, что положение L17 в области VL занимает E.

161. Гуманизированное антитело по п. 152, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L2 занимает I или V, L17 занимает Q или E, и L36 занимает F или L.

162. Гуманизированное антитело по п. 161, при условии, что положение L17 в области VL занимает E.

163. Гуманизированное антитело по п. 161, при условии, что положения L2, L17 и L36 в области VL занимает V, E и L.

164. Гуманизированное антитело по п. 152, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 113-115, и зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 116-118.

165. Гуманизированное антитело по п. 164, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 113-115, и зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 116-118.

166. Гуманизированное антитело по п. 165, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 113-115, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 116-118.

167. Гуманизированное антитело по п. 166, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116.

168. Гуманизированное антитело по п. 166, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:113, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117.

169. Гуманизированное антитело по п. 166, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118.

170. Гуманизированное антитело по п. 166, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116.

171. Гуманизированное антитело по п. 166, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117.

172. Гуманизированное антитело по п. 166, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118.

173. Гуманизированное антитело по п. 166, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116.

174. Гуманизированное антитело по п. 166, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117.

175. Гуманизированное антитело по п. 166, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118.

176. Антитело по п. 1, содержащее три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 7G6, причем указанное 7G6 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется переменной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 119, и

вариабельной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO:120.

177. Антитело по п. 176, отличающееся тем, что указанные три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 121, 122 и 123), и указанные три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 124, 125 и 126).

178. Антитело по п. 1, которое представляет собой 7G6 или химерную, венированную или гуманизированную форму указанного антитела.

179. Антитело по п. 178, отличающееся тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$.

180. Антитело по п. 178, отличающееся тем, что указанная вариабельная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$.

181. Антитело по п. 178, отличающееся тем, что каждая из указанных вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$.

182. Антитело по любому из пп. 1, 2 и 176-181, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

183. Антитело по п. 178, которое представляет собой гуманизированное или химерное антитело 7G6, которое специфично связывается с тау человека, причем указанное 7G6 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:119 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:120.

184. Гуманизированное антитело по п. 183, содержащее гуманизированную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR тяжелой цепи 7G6, и гуманизированную зрелую вариабельную область легкой цепи, которая содержит три CDR легкой цепи 7G6.

185. Гуманизированное антитело по п. 184, отличающееся тем, что указанные CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения.

186. Гуманизированное антитело по п. 185, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 121-

123), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 124-126).

187. Гуманизированное антитело по п. 185, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно Кэботу (SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:122 и SEQ ID NO:123), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 124-126).

188. Гуманизированное антитело по п. 185, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно Чотиа (SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130 и SEQ ID NO:123), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 124-126).

189. Гуманизированное антитело по п. 185, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно AbM (SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:131 и SEQ ID NO:123), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно AbM (SEQ ID NO: 124-126).

190. Гуманизированное антитело по п. 185, отличающееся тем, что указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно контактному определению (SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:132 и SEQ ID NO: 133)), и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи 7G6 содержит три CDR легкой цепи согласно контактному определению (SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:135 и SEQ ID NO:136).

191. Гуманизированное антитело по любому из пп. 183-190, содержащее гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO:139-140, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 141-148.

192. Гуманизированное антитело по п. 191, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает V, H20 занимает L, H69 занимает I, H76 занимает N, H78 занимает A, H80 занимает L, H81 занимает Q, H92 занимает S, и H93 занимает T.

193. Гуманизированное антитело по п. 192, при условии, что положения H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93, H101 в области VH занимает V, L, I, N, A, L, Q, S и T, соответственно.

194. Гуманизированное антитело по п. 191, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает K или V, H20 занимает V или L, H38 занимает R или K, H69 занимает M или I, H76 занимает S или N, H78 занимает V или A, H80 занимает M или L, H81 занимает E или Q, H92 занимает C или S, и H93 занимает A или T.

195. Гуманизированное антитело по п. 194, при условии, что положения H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 в области VH занимает V, L, I, N, A, L, Q, S и T, соответственно.

196. Гуманизированное антитело по п. 194, при условии, что положения H12, H20, H38, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 в области VH занимает V, L, K, I, N, A, L, Q, S и T, соответственно.

197. Гуманизированное антитело по п. 191, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, и L103 занимает K.

198. Гуманизированное антитело по п. 197, при условии, что положения L12 и L103 в области VL занимает S и K, соответственно.

199. Гуманизированное антитело по п. 191, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L36 занимает L, и L103 занимает K.

200. Гуманизированное антитело по п. 199, при условии, что положения L12, L36 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно.

201. Гуманизированное антитело по п. 191, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L37 занимает L, и L103 занимает K.

202. Гуманизированное антитело по п. 201, при условии, что положения L12, L37 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно.

203. Гуманизированное антитело по п. 191, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L36 занимает L, L37 занимает L, и L103 занимает K.

204. Гуманизированное антитело по п. 203, при условии, что положения L12, L36, L37 и L103 в области VL занимает S, L, L и K, соответственно.

205. Гуманизированное антитело по п. 191, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L45 занимает K, и L103 занимает K.

206. Гуманизированное антитело по п. 205, при условии, что положения L12, L45 и L103 в области VL занимает S, K и K, соответственно.

207. Гуманизированное антитело по п. 191, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L12 занимает S, L100 занимает G, и L103 занимает K.

208. Гуманизированное антитело по п. 207, при условии, что положения L12, L100 и L103 в области VL занимает S, G и K, соответственно.

209. Гуманизированное антитело по п. 191, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L36 занимает F или L, L37 занимает Q или L, L45 занимает R или K, L100 занимает Q или G.

210. Гуманизированное антитело по п. 209, при условии, что положения L12 и L103 в области VL занимает S и K, соответственно.

211. Гуманизированное антитело по п. 209, при условии, что положения L12, L37 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно.

212. Гуманизированное антитело по п. 209, при условии, что положения L12, L36 и L103 в области VL занимает S, L и K, соответственно.

213. Гуманизированное антитело по п. 209, при условии, что положения L12, L36, L37 и L103 в области VL занимает S, L, L и K, соответственно.

214. Гуманизированное антитело по п. 209, при условии, что положения L12, L45 и L103 в области VL занимает S, K и K, соответственно.

215. Гуманизированное антитело по п. 209, при условии, что положения L12, L36, L37, L45 и L103 в области VL занимает S, L, L, K и K, соответственно.

216. Гуманизированное антитело по п. 209, при условии, что положения L12, L100 и L103 в области VL занимает S, G и K, соответственно, как в hu7G6-VL_v7.

217. Гуманизированное антитело по п. 209, при условии, что положения L12, L36, L37, L100 и L103 в области VL занимает S, L, L, G и K, соответственно.

218. Гуманизированное антитело по п. 191, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 139-140, и зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 141-148.

219. Гуманизированное антитело по п. 218, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 139-140, и зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 141-148.

220. Гуманизированное антитело по п. 219, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 139-140, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 141-148.

221. Гуманизированное антитело по п. 220, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:141.

222. Гуманизированное антитело по п. 220, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:142.

223. Гуманизированное антитело по п. 220, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:143.

224. Гуманизированное антитело по п. 220, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:144.

225. Гуманизированное антитело по п. 220, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145.

226. Гуманизированное антитело по п. 220, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139, и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:146.

последовательность SEQ ID NO:140, и указанная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147.

236. Гуманизированное антитело по п. 220, отличающееся тем, что указанная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:140, и указанная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:148.

237. Антитело по любому из пп. 1-5, 101-103, 137-139 и 176-178, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой химерное антитело.

238. Антитело по любому из пп. 1-5, 101-103, 137-139 и 176-178, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой венеризованное антитело.

239. Антитело по любому из пп. 1-238, которое представляет собой интактное антитело.

240. Антитело по любому из пп. 1-238, которое представляет собой связывающий фрагмент.

241. Антитело по п. 240, отличающееся тем, что указанный связывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, Fab или Fab'2-фрагмент.

242. Антитело по любому из пп. 1-238, которое представляет собой Fab-фрагмент или одноцепочечный Fv.

243. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный изотип представляет собой IgG1 человека.

244. Гуманизированное антитело по любому из пп. 10-100, 108-136, 144-175, 183-236 и 239-243, отличающееся тем, что указанная зрелая вариабельная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, и указанная зрелая вариабельная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи.

245. Гуманизированное антитело по п. 244, отличающееся тем, что указанная константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области тяжелой цепи человека, которая характеризуется пониженным связыванием с рецептором Fcγ по сравнению с природной константной областью тяжелой цепи человека.

246. Гуманизированное антитело по п. 244 или 245, отличающееся тем, что указанная константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1.

247. Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое характеризуется по меньшей мере одной мутацией в константной области.

248. Антитело по п. 247, отличающееся тем, что указанная мутация снижает фиксацию или активацию комплемента константной областью.

249. Антитело по п. 248, содержащее мутацию в одном или нескольких из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 и 331 согласно нумерации EU.

250. Антитело по п. 249, содержащее аланин в положениях 318, 320 и 322.

251. Антитело по любому из пп. 1-245, отличающееся тем, что указанный изотип относится к изотипу IgG2 или IgG4 человека.

252. Антитело по любому из пп. 1-251, отличающееся тем, что указанное антитело является по меньшей мере на 95% масс./масс. чистым.

253. Антитело по любому предшествующему пункту, отличающееся тем, что указанное антитело конъюгировано с терапевтическим, цитотоксическим, цитостатическим, нейротрофическим или нейропротекторным средством.

254. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, как определено в любом из пп. 1-253, и фармацевтически приемлемый носитель.

255. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и/или легкую цепь антитела, как описано в любом из пп. 1-254.

256. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 255.

257. Клетка-хозяин, трансформированная рекомбинантным вектором экспрессии по п. 256.

258. Способ гуманизации антитела мыши, причем указанный способ включает:

(a) отбор одного или нескольких акцепторных антител;

(b) идентификацию остатков аминокислот антитела мыши, которые следует сохранить;

(c) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и

(d) экспрессию указанных нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизированного антитела;

причем указанное антитело мыши представляет собой 5G8, причем указанное 5G8 характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:8.

259. Способ гуманизации антитела мыши, причем указанный способ включает:

(a) отбор одного или нескольких акцепторных антител;

(b) идентификацию остатков аминокислот антитела мыши, которые следует сохранить;

(c) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и

(d) экспрессию указанных нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизованного антитела;

причем указанное антитело мыши представляет собой 6A10, причем указанное 6A10 характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 63 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:64.

260. Способ гуманизации антитела мыши, причем указанный способ включает:

(a) отбор одного или нескольких акцепторных антител;

(b) идентификацию остатков аминокислот антитела мыши, которые следует сохранить;

(c) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и

(d) экспрессию указанных нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизованного антитела;

причем указанное антитело мыши представляет собой 8A4, причем указанное 8A4 характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 91 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:92.

261. Способ гуманизации антитела мыши, причем указанный способ включает:

(a) отбор одного или нескольких акцепторных антител;

(b) идентификацию остатков аминокислот антитела мыши, которые следует сохранить;

(c) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и

(d) экспрессию указанных нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизированного антитела;

причем указанное антитело мыши представляет собой 7G6, причем указанное 7G6 характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 119 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO:120.

262. Способ получения гуманизированного, химерного или венированного антитела, причем указанный способ включает:

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

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

причем указанное антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6.

263. Способ получения линии клеток, продуцирующей гуманизированное, химерное или венированное антитело, причем указанный способ включает в себя:

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

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

(c) выделение единичных клеток из отобранных клеток; и

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

причем указанное антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6.

264. Способ по п. 263, дополнительно включающий в себя размножение клеток в селективных условиях и скрининг в отношении линий клеток, естественным образом экспрессирующих и секретирующих по меньшей мере 100 мг/л/10⁶ клеток/24 ч.

265. Способ ингибирования или снижения агрегации тау у субъекта, который страдает от опосредованного тау амилоидоза или подвержен риску развития опосредованного тау амилоидоза, причем указанный способ включает в себя введение указанному субъекту эффективного режима антитела по любому из пп. 1-254, и посредством этого ингибирование или снижение агрегации тау у указанного субъекта.

266. Способ по п. 265, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированную версию 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6.

267. Способ лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанный способ включает в себя введение эффективного режима антитела, как определено в любом из пп. 1-254, и посредством этого лечение или осуществление профилактики указанного заболевания.

268. Способ по п. 267, отличающийся тем, что указанное связанное с тау заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичную возрастную таупатию, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическую деменцию или деменцию боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа C, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь аргирофильных зерен, глобулярную глиальную таупатию, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальную дегенерацию (КБД), деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

269. Способ по п. 268, отличающийся тем, что указанное связанное с тау заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

270. Способ по п. 269, отличающийся тем, что указанный пациент представляет собой носителя ApoE4.

271. Способ снижения нарушенной передачи тау, причем указанный способ включает в себя введение эффективного режима антитела, как определено в любом из пп. 1-254, и посредством этого снижение передачи тау.

272. Способ индукции фагоцитоза тау, причем указанные способы включают в себя введение эффективного режима антитела 1-254, и посредством этого индукцию фагоцитоза тау.

273. Способ ингибирования агрегации или накопления тау, причем указанный способ включает введение эффективного режима антитела, как определено в любом из пп. 1-254, и посредством этого ингибирование агрегации или накопления тау.

274. Способ ингибирования образования клубков тау, причем указанный способ включает введение эффективного режима антитела, как определено в любом из пп. 1-254.

275. Способ обнаружения отложений тау-белка у субъекта, страдающего от или подверженного риску развития заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, причем указанный способ включает введение указанному субъекту антитела, как определено в любом из пп. 1-254, и обнаружение антитела, связавшегося с тау, у указанного субъекта.

276. Способ по п. 275, отличающийся тем, что указанное заболевание, связанное с агрегацией или накоплением тау, представляет собой болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичную возрастную таупатию, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическую деменцию или деменцию боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь аргирофильных зерен, глобулярную глиальную таупатию, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальную дегенерацию (КБД), деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

277. Способ по п. 276, отличающийся тем, что указанное антитело вводят посредством внутривенной инъекции в организм субъекта.

278. Способ по п. 276, отличающийся тем, что указанное антитело вводят непосредственно в головной мозг субъекта посредством внутричерепной инъекции или посредством сверления отверстия в черепе субъекта.

279. Способ по п. 276, отличающийся тем, что указанное антитело является меченым.

280. Способ по п. 279, отличающийся тем, что указанное антитело является меченым флуоресцентной меткой, парамагнитной меткой или радиоактивной меткой.

281. Способ по п. 280, отличающийся тем, что указанную радиоактивную метку обнаруживают с применением позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

282. Способ измерения эффективности лечения у субъекта, который получает лечение заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, причем указанный способ включает

(а) измерение первого уровня отложений тау-белка у указанного субъекта до лечения посредством введения указанному субъекту антитела, как определено в любом из пп. 1-254, и обнаружение первого количества антитела, связавшегося с тау, у указанного субъекта,

(b) введение указанному субъекту лечения,

(с) измерение второго уровня отложений тау-белка у указанного субъекта после лечения посредством введения указанному субъекту антитела, и обнаружение антитела, связавшегося с тау, у указанного субъекта,

причем снижение уровня отложений тау-белка свидетельствует о положительном ответе на лечение.

283. Способ измерения эффективности лечения у субъекта, который получает лечение заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, причем указанный способ включает:

(a) измерение первого уровня отложений тау-белка у указанного субъекта до лечения посредством введения указанному субъекту антитела, как определено в любом из пп. 1-254, и обнаружение первого количества антитела, связавшегося с тау, у указанного субъекта,

(b) введение указанному субъекту лечения,

(c) измерение второго уровня отложений тау-белка у указанного субъекта после лечения посредством введения указанному субъекту антитела и обнаружение второго количества антитела, связавшегося с тау, у указанного субъекта,

причем отсутствие изменения уровня отложений тау-белка или незначительное увеличение отложений тау-белка свидетельствует о положительном ответе на лечение.

284. Выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с пептидом, состоящим из остатков 199-213 SEQ ID NO:3.

285. Выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с пептидом, состоящим из остатков 262-276 SEQ ID NO:3.

286. Выделенное моноклональное антитело по п. 285, которое специфично связывается как с пептидом, состоящим из остатков 199-213 SEQ ID NO:3, так и с пептидом, состоящим из остатков 262-276 SEQ ID NO:3.

287. Выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с полипептидом согласно SEQ ID NO:3 на эпитопе, содержащем по меньшей мере один остаток в пределах 199-213 SEQ ID NO:3.

288. Выделенное моноклональное антитело по п. 287, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 199-213 SEQ ID NO:3.

289. Выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с полипептидом согласно SEQ ID NO:3 на эпитопе, содержащем по меньшей мере один остаток в пределах 262-276 SEQ ID NO:3.

290. Выделенное моноклональное антитело по п. 289, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 262-276 SEQ ID NO:3.

291. Выделенное моноклональное антитело по любому из пп. 287-290, которое специфично связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере один остаток как из 199-213, так и из 262-276 SEQ ID NO:3.

292. Способ лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение иммуногена, содержащего пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 5G8, причем указанный пептид вызывает образование антител, которые специфично связываются с тау, у субъекта.

293. Способ лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение иммуногена, содержащего пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 6A10, причем указанный пептид вызывает образование антител, которые специфично связываются с тау, у субъекта.

294. Способ лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение иммуногена, содержащего пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 8A4, причем указанный пептид вызывает образование антител, которые специфично связываются с тау, у субъекта.

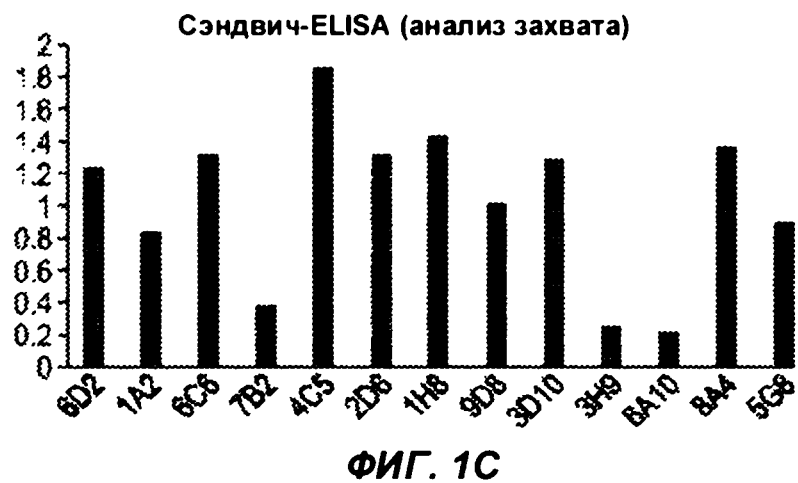
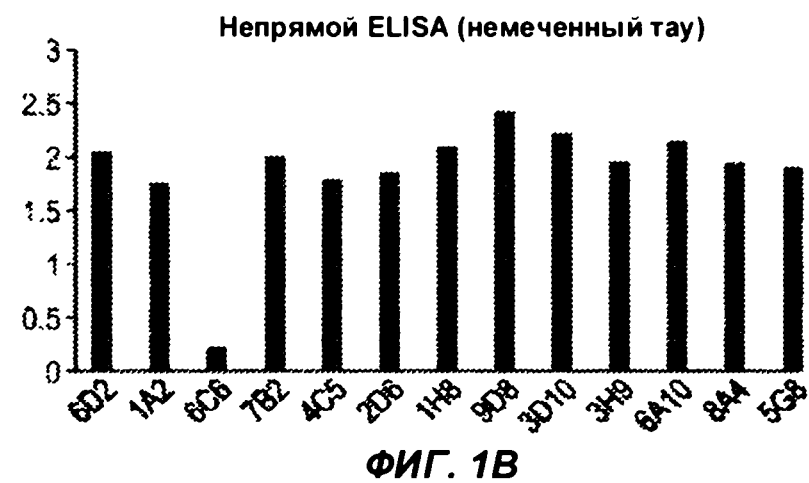
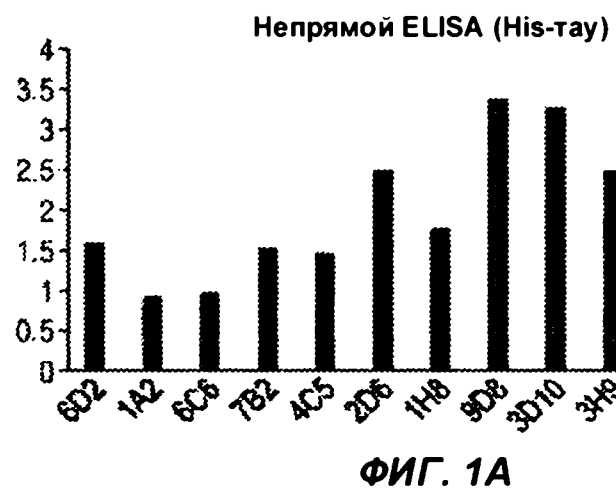
295. Способ лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение иммуногена, содержащего пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 7G6, причем указанный пептид вызывает образование антител, которые специфично связываются с тау, у субъекта.

296. Способ лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение иммуногена, содержащего пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO:3, с которым специфично связывается антитело 3D6, причем указанный пептид вызывает образование антител, которые специфично связываются с тау, у субъекта.

297. Способ по любому из пп. 292-296, отличающийся тем, что по меньшей мере два из антител 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 и 3D6 специфично связываются с пептидом тау.

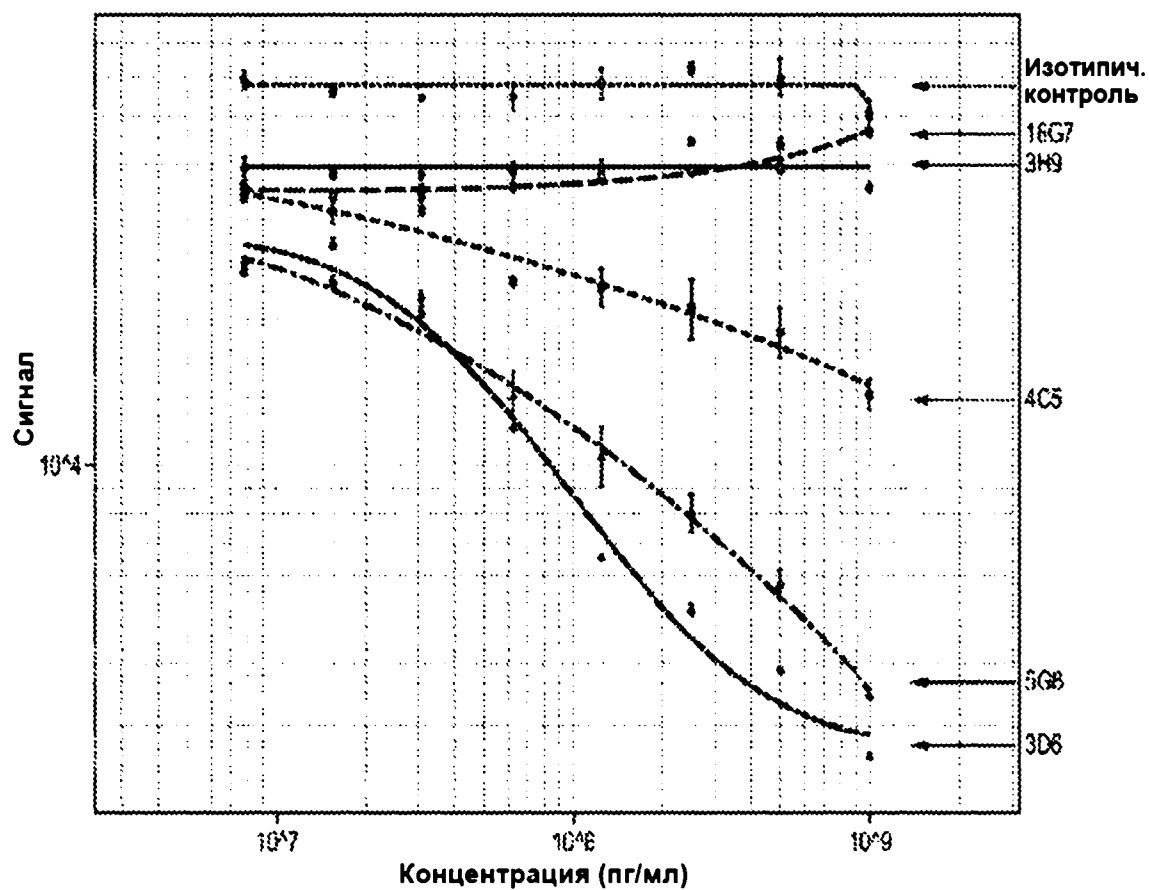
298. Способ по любому из пп. 292-297, отличающийся тем, что указанный эпитоп пептида тау состоит из 4-11 смежных аминокислот из остатков 199-213 SEQ ID NO:3 или из остатков 262-276 SEQ ID NO:3.

299. Способ по любому из пп. 292-297, отличающийся тем, что указанный эпитоп пептида тау состоит из двух смежных сегментов аминокислот: одного сегмента из остатков 199-213 SEQ ID NO:3, и другого – из остатков 262-276 SEQ ID NO:3, причем указанные два смежных сегмента в сумме состоят из 4-11 аминокислот.

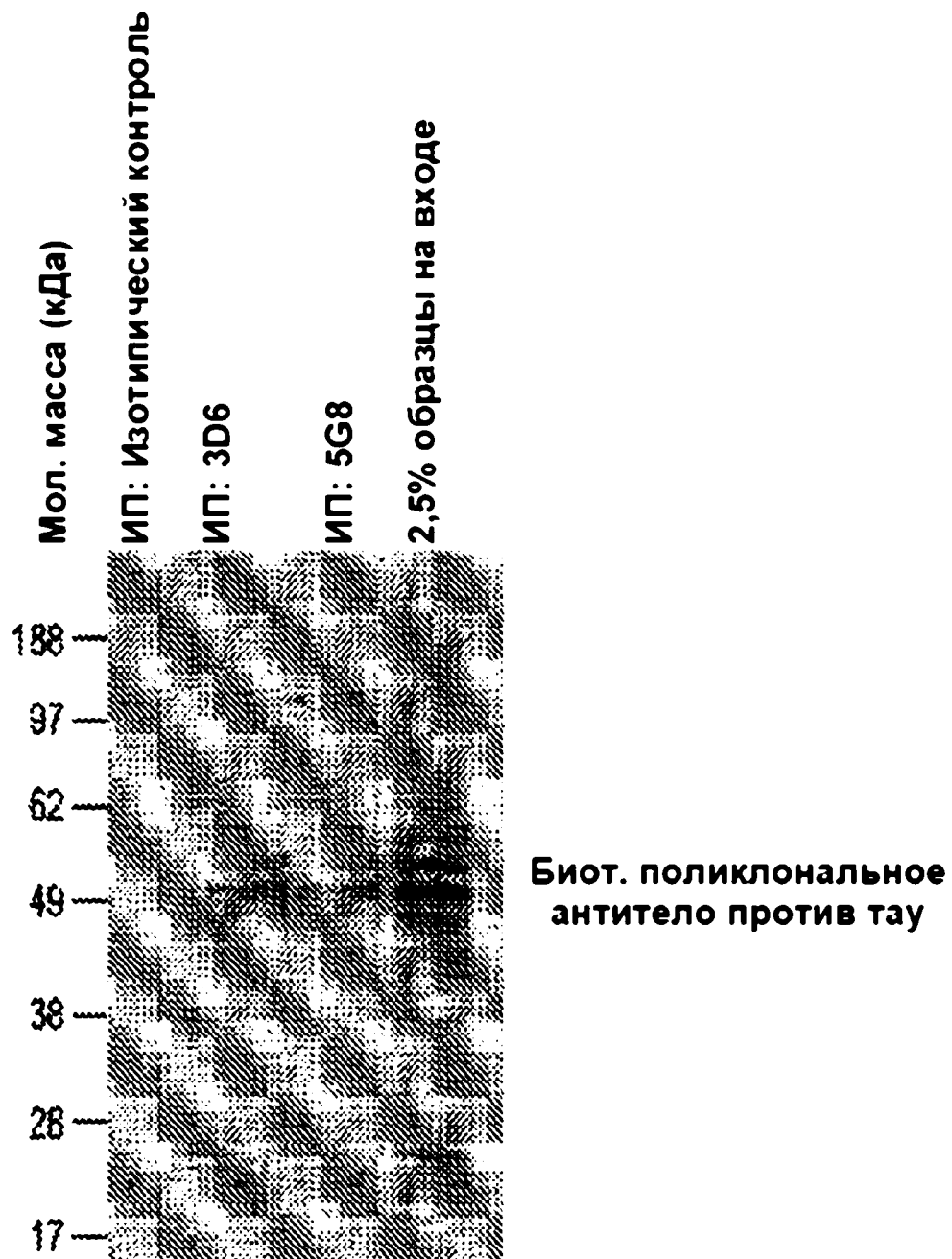


Название	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (нМ)
3D6	2.58×10^6	1.19×10^{-3}	0.46
1H6	5.07×10^6	5.61×10^{-3}	11.1
3H9	4.71×10^6	1.41×10^{-3}	3.0
5G8	3.75×10^6	2.54×10^{-3}	6.78
6D2	3.83×10^6	3.18×10^{-3}	8.29
7G6	5.76×10^6	3.32×10^{-3}	5.77
8A4	5.99×10^6	2.27×10^{-3}	3.8

ФИГ. 2



ФИГ. 3

**ФИГ. 4**

ФИГ. 5А

	90 100 110	
5G8-VH	L H L S S L T S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T T L T V S S	112 (SEQ ID NO: 7)
aDabi-Fab2b-VH	M E L S S L R S E D T A V Y Y C T I G T S G Y D Y F D Y W G Q G T L V T V S S	119 (SEQ ID NO: 28)
hu5G8-VH_v1	M E L S S L R S E D T A V Y Y C T I - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S	112 (SEQ ID NO: 33)
hu5G8-VH_v2	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S	112 (SEQ ID NO: 34)
hu5G8-VH_v3	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S	112 (SEQ ID NO: 35)
hu5G8-VH_v4	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S	112 (SEQ ID NO: 36)
hu5G8-VH_v5	L E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S	112 (SEQ ID NO: 37)
hu5G8-VH_v6	L E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S	112 (SEQ ID NO: 38)
hu5G8-VH_v7	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S	112 (SEQ ID NO: 39)
hu5G8-VH_v8	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S	112 (SEQ ID NO: 40)

ФИГ. 5В

ФИГ. 6А

	90	100	110	
5G8-VL	R R V E A E D L G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 8)
aDabi-Fab2b-VL	S R V E A E D V G V Y Y C F Q A S H V P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 31)
hu5G8-VL_v1	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 41)
hu5G8-VL_v2	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 42)
hu5G8-VL_v3	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 43)
hu5G8-VL_v4	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 44)
hu5G8-VL_v5	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 45)
hu5G8-VL_v6	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 46)

ФИГ. 6В

	-----+-----	
	10 20 30 40	
	-----+-----+-----+-----	
белок 6A10VH	E V Q L Q Q S G A E L V R S G A S V K L S C T A S G L N I K D Y Y I H W V K Q R	40
ACR16112 VH	Q V Q L Q E S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T G Y Y M H W V R Q A	40
hu6A10VH_v1	Q V Q L Q E S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G L N I K D Y Y I H W V R Q A	40
hu6A10VH_v2	Q V Q L Q E S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G L N I K D Y Y I H W V R Q A	40
hu6A10VH_v3	Q V Q L Q E S G A E V K K P G G S V K V S C K A S G L N I K D Y Y I H W V R Q A	40
	-----+-----+-----+-----	
	50 60 70 80	
	-----+-----+-----+-----	
белок 6A10VH	P E Q G L E W I G W I D P E N D D T E Y A P K F Q G R A T L T T D T S S N T A Y	80
ACR16112 VH	P G Q G L E W M G W I N P N S G D T N Y A Q K F Q G R V T T T R D T S I S T A Y	80
hu6A10VH_v1	P G Q G L E W M G W I D P E N D D T E Y A P K F Q G R V T T T R D T S I S T A Y	80
hu6A10VH_v2	P G Q G L E W I G W I D P E N D D T E Y A P K F Q G R V T T T R D T S I S T A Y	80
hu6A10VH_v3	P G Q G L E W I G W I D P E N D D T E Y A P K F Q G R V T I T R D T S I S T A Y	80
	 -----+----- 90 100 110 -----+-----+-----+-----	
белок 6A10VH	L Q L S S L T S E D T A V Y Y C T P - - - - L D Y W G Q G T S V T V S S	112 (SEQ ID NO: 63)
ACR16112 VH	M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R L A A R P L D Y W G Q G T L V T V S S	117 (SEQ ID NO: 81)
hu6A10VH_v1	M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R - - - - L D Y W G Q G T L V T V S S	112 (SEQ ID NO: 85)
hu6A10VH_v2	M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R - - - - L D Y W G Q G T L V T V S S	112 (SEQ ID NO: 86)
hu6A10VH_v3	L E L S R L R S D D T A V Y Y C A R - - - - L D Y W G Q G T L V T V S S	112 (SEQ ID NO: 87)

ФИГ. 7

	10	20	30	40	
Белок 6A10VL	D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
ABC66863VL	D I V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L V Y S D G N T Y L N W				40
hu6A10VL_v1	D I V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu6A10VL_v2	D I V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu6A10VL_v3	D I V M T Q S P L S L S V T L G E P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
	50	60	70	80	
Белок 6A10VL	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I				80
ABC66863VL	F Q Q R P G Q S P R R L I Y K V S N R D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu6A10VL_v1	F Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu6A10VL_v2	F Q Q R P G Q S P R L L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu6A10VL_v3	F Q Q R P G Q S P R L L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
	90	100	110		
Белок 6A10VL	S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 64)	
ABC66863VL	S R V E A E D V G V Y Y C M Q G T H R P L T F G G G T K V E I K			112 (SEQ ID NO: 83)	
hu6A10VL_v1	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K V E I K			112 (SEQ ID NO: 88)	
hu6A10VL_v2	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K V E I K			112 (SEQ ID NO: 89)	
hu6A10VL_v3	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K V E I K			112 (SEQ ID NO: 90)	

ФИГ. 8

ФИГ. 9

	-----+-----+-----+-----+			
	10	20	30	40
	-----+-----+-----+-----+			
Белок 7G6VH	E V Q L Q Q S G A E L V R P G A L V K L S C K A S G F N I K D Y Y I H W V K Q R			40
3U0T VH	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y Y T E A Y Y I H W V R Q A			40
hu7G6VHv1	Q V Q L V Q S G A E V V K P G A S V K L S C K A S G F N I K D Y Y I H W V R Q A			40
hu7G6VHv2	Q V Q L V Q S G A E V V K P G A S V K L S C K A S G F N I K D Y Y I H W V K Q A			40
	-----+-----+-----+-----+			
	50	60	70	80
	-----+-----+-----+-----+			
Белок 7G6VH	P E Q G L E W I G W I D P E N G E T V Y D P K F Q G K A S I T S D T S S N T A Y			80
3U0T VH	P G Q G L E W M G R I D P A T G N T K Y A P R L Q D R V T M T R D T S T S T V Y			80
hu7G6VHv1	P G Q G L E W M G W I D P E N G E T V Y D P K F Q G R V T I T R D T S T N T A Y			80
hu7G6VHv2	P G Q G L E W M G W I D P E N G E T V Y D P K F Q G R V T I T R D T S T N T A Y			80
	-----+-----+-----+-----+			
	90	100	110	
	-----+-----+-----+-----+			
Белок 7G6VH	L Q L R S L T S E D T A V Y Y S T S L D - - - F W G Q G T S V T V S S			112
3U0T VH	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A S L Y S L P V Y W G Q G T T V T V S S			116
hu7G6VHv1	L Q L S S L R S E D T A V Y Y S T S L D - - - F W G Q G T T V T V S S			112
hu7G6VHv2	L Q L S S L R S E D T A V Y Y S T S L D - - - F W G Q G T T V T V S S			112

	10	20	30	40	
Белок 7G6VL	D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W				40
3U0T VL	D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L Y S D A K T Y L N W				40
hu7G6VLv1	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu7G6VLv2	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu7G6VLv3	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu7G6VLv4	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu7G6VLv5	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu7G6VLv6	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu7G6VLv7	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu7G6VLv8	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W				40
	50	60	70	80	
Белок 7G6VL	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I				80
3U0T VL	F Q Q R P G Q S P R R L I Y Q I S R L D P G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu7G6VLv1	F Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu7G6VLv2	F L Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu7G6VLv3	L Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu7G6VLv4	L L Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu7G6VLv5	F Q Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu7G6VLv6	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu7G6VLv7	F Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu7G6VLv8	L L Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80

	-----+-----+-----+-----	
	90100110	
	-----+-----+-----+-----	
Белок 7G6VL	S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K	112 (SEQ ID NO: 120)
3U0T VL	S R V E A E D V G V Y Y C L Q G T H Y P V L F G Q G T R L E I K R	113 (SEQ ID NO: 138)
hu7G6VLv1	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R	113 (SEQ ID NO: 141)
hu7G6VLv2	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R	113 (SEQ ID NO: 142)
hu7G6VLv3	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R	113 (SEQ ID NO: 143)
hu7G6VLv4	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R	113 (SEQ ID NO: 144)
hu7G6VLv5	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R	113 (SEQ ID NO: 145)
hu7G6VLv6	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R	113 (SEQ ID NO: 146)
hu7G6VLv7	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K R	113 (SEQ ID NO: 147)
hu7G6VLv8	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K R	113 (SEQ ID NO: 148)

ФИГ. 12В