



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.04

(51) Int. Cl. **C07K 14/47** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890172

(22) Дата подачи заявки
2016.07.05

(54) ТАУ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ АНТИТЕЛА

(31) 15175522.0

(32) 2015.07.06

(33) EP

(43) 2018.10.31

(86) PCT/EP2016/065813

(87) WO 2017/005734 2017.01.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
**Найт Дэвид Эдвард Ормонд, Бейкер
Теренс Сьюард, Макмиллан Дэвид
Джеймс, Гриффин Роберт Энтони
(GB), Мере-Козлло Жорж, Дауни
Патрик, Курад Жан-Филипп (BE)**

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

(56) WO-A2-2013096380
WO-A2-2014028777
WO-A2-2010142423

MERCKEN M ET AL.: "MONOCLONAL ANTIBODIES WITH SELECTIVE SPECIFICITY FOR ALZHEIMER TAU ARE DIRECTED AGAINST PHOSPHATASE-SENSITIVE EPITOPES", ACTA NEUROPATHOLOGICA, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 84, no. 3, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 265-272, XP008049337, ISSN: 0001-6322, DOI: 10.1007/BF00227819, Discussion; figure 7

MACCIONI R B ET AL.: "Anomalous phosphorylated tau and Abeta fragments in the CSF

correlates with cognitive impairment in MCI subjects", NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, vol. 27, no. 2, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 237-244, XP024993014, ISSN: 0197-4580, DOI: 10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2005.01.011 [retrieved on 2006-02-01] page 239, right-hand column, paragraph 3

BUEE L ET AL.: "TAU PROTEIN ISOFORMS, PHOSPHORYLATION AND ROLE IN NEURODEGENERATIVE DISORDERS", BRAIN RESEARCH REVIEWS, ELSEVIER, NL, vol. 33, no. 1, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 95-130, XP000974598, ISSN: 0165-0173, DOI: 10.1016/S0165-0173(00)00019-9 page 99, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph first

HEIKO BRAAK ET AL.: "Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes", NEUROBIOLOGY OF AGING., vol. 16, no. 3, 1 May 1995 (1995-05-01), pages 271-278, XP055219625, US, ISSN: 0197-4580, DOI: 10.1016/0197-4580(95)00021-6, the whole document
FLORENCE CLAVAGUERA ET AL.: ""Prion-Like" Templated Misfolding in Tauopathies", BRAIN PATHOLOGY., vol. 23, no. 3, 16 April 2013 (2013-04-16), pages 342-349, XP055219682, CH, ISSN: 1015-6305, DOI: 10.1111/bpa.12044, the whole document

KIRAN YANAMANDRA ET AL.: "Anti-tau antibody reduces insoluble tau and decreases brain atrophy", ANNALS OF CLINICAL AND TRANSLATIONAL NEUROLOGY, vol. 2, no. 3, 23 January 2015 (2015-01-23), pages 278-288, XP055223617, GB, ISSN: 2328-9503, DOI: 10.1002/acn3.176, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к выделенным Тау-связывающим антителам или их связывающим фрагментам. Также изобретение относится к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим легкую и/или тяжелую цепь указанных антител, к клонирующему или экспрессирующему вектору, к клетке-хозяину, продуцирующей указанные антитела, к способу получения указанных антител и их связывающих фрагментов. Настоящее изобретение, кроме того, относится к применению антител и их связывающих фрагментов в качестве терапевтически активного средства для использования в лечении таупатии, где таупатиями являются болезнь Альцгеймера или прогрессирующий надъядерный паралич, а также к применению антител и их связывающих фрагментов в качестве диагностического средства диагностирования таупатии.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится, в частности, к терапевтическим и диагностическим Тау-связывающим антителам и их связывающим фрагментам, способам получения таких антител и их использования для лечения и/или диагностирования таупатий, таких как болезнь Альцгеймера; амиотрофический боковой склероз/комплекс паркинсонизм-деменция; болезнь аргирофильных зерен; хроническая травматическая энцефалопатия; кортикобазальная дегенерация; диффузные нейрофибрилярные клубки с кальцификацией; синдром Дауна; семейная британская деменция; семейная датская деменция; лобно-височная деменция и паркинсонизм, сцепленный с хромосомой 17, обусловленный мутациями MAPT; болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера; гваделупский паркинсонизм; миотоническая дистрофия; нейродегенерация с накоплением железа головном мозге; болезнь Ниманна-Пика, тип С; негуамская болезнь двигательных нейронов с нейрофибрилярными клубками; болезнь Пика; постэнцефалитический паркинсонизм; прионная церебральная амилоидная ангиопатия; прогрессирующий подкорковый глиоз; прогрессирующий надъядерный паралич; умственная отсталость, связанная с SLC9A6; подострый склерозирующий панэнцефалит; деменция с преобладанием нейрофибрилярных клубков; таупатия белого вещества с глобулярными глиальными включениями (Clavaguera et al. Brain Pathology 23 (2013) 342-349). Настоящее изобретение также относится к способам лечения человеческого субъекта, страдающего вышеописанными таупатиями или предположительно склонного к ним, в частности к таким таупатиям, как болезнь Альцгеймера и прогрессирующий надъядерный паралич.

Предпосылки изобретения

Болезнь Альцгеймера (AD) и прогрессирующий надъядерный (PSP) представляют собой нейродегенеративные заболевания, с которыми связана высокая неудовлетворенная медицинская потребность, высокие расходы для систем общественного здравоохранения и значительное бремя для пораженных семей. Клинические признаки AD включают потерю памяти, когнитивной, аргументационной, рассудочной и эмоциональной стабильности и в конечном итоге смерть. PSP влечет за собой серьезные и прогрессирующие проблемы с контролем походки и равновесием, падения, нарушение вертикальных движений глаз, когнитивные проблемы, депрессию, апатию и легкую деменцию. Поздние симптомы включают нечеткость зрения, неконтролируемые движения глаз, неразборчивую речь, затруднения при глотании и смерть.

В течение больше чем десяти лет программы по модификации заболевания AD были направлены на бета-амилоидный пептид через различные механизмы. В отличие от них, значительно меньший прогресс достигнут в направленном воздействии на патологию внутриклеточного Тау, второй основной признак AD.

Нейрофибрилярные включения или клубки, содержащие агрегированный, гиперфосфорилированный Тау, являются определяющей характеристикой AD патологии и многих других таупатий, включая PSP.

При этих заболеваниях существует выраженная корреляция между прогрессированием симптомов и уровнем и распределением интраневральных Тау-агрегатов. При AD нейрональные Тау-клубки сначала появляются в транзенториальной коре, откуда они распространяются в гиппокамп и неокортекс. Клубки, наблюдаемые в AD нейронах, состоят из гиперфосфорилированного агрегированного нерастворимого Тау. Сделано предположение, что в заболевание вносят вклад непосредственные токсические эффекты патологических Тау-частиц и/или нарушение аксонального транспорта из-за секвестрации функционального Тау в гиперфосфорилированные и агрегированные формы, которые более не способны обеспечить аксональный транспорт.

В своем не патологическом состоянии Тау представляет собой хорошо растворимый цитоплазматический белок, связывающий микротрубочки, который встречается в центральной нервной системе человека (CNS) в 6 основных изоформах из-за альтернативного сплайсинга в диапазоне от 352 до 441 аминокислоты в длину. Эти изоформы могут иметь ноль, одну или две N-концевых вставки (0N, 1N, 2N) и три или четыре последовательности C-концевого "повтора" (3R или 4R). Эти последовательности C-концевых повторов из 30-32 аминокислот, R1, R2, R3 и R4, вместе образуют область связывания микротрубочек Тау (MTBR). В действительности полагают, что основная роль Тау состоит в сборке и стабилизации аксональных микротрубочек. Микротрубочки образуют рельсы для аксонального транспорта и элементы цитоскелета для клеточного роста (Clavaguera et al., Brain Pathology 23 (2013) 342-349). Показано, что три изоформы Тау содержат три области связывания микротрубочек (MTBR):

изоформа 4, также обозначаемая как 3R0N, эталонная последовательность NCBI NP_058525.1 (352 аминокислоты),

изоформа 7, также обозначаемая как 3R1N, эталонная последовательность NCBI NP_001190180.1 (381 аминокислота),

изоформа 8, также обозначаемая как 3R2N, эталонная последовательность NCBI NP_001190181.1 (410 аминокислот).

Тогда как другие три изоформы Тау содержат четыре MTBR:

изоформа 2, также обозначаемая как 4R2N, эталонная последовательность NCBI NP_005901.2 (441 аминокислота),

изоформа 3, также обозначаемая как 4R0N, эталонная последовательность NCBI NP_058518.1 (383 аминокислота),

изоформа 5, также обозначаемая как 4R1N, эталонная последовательность NCBI NP_001116539.1 (412 аминокислот).

В настоящее время для этих заболеваний доступно только симптоматическое лечение, дающее слабый или нулевой эффект. В настоящее время не доступно лечение для замедления или в идеале остановки развития заболевания. Следовательно, в данной области сохраняется потребность в новых соединениях и композициях, которые можно использовать при лечении таупатий.

Цели и сущность изобретения

Цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы, в частности, предоставлять средства для лечения или диагностирования таупатий, таких как болезнь Альцгеймера (AD) или прогрессирующий надъядерный паралич (PSP). Кроме того, цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы предоставить, в частности, способы лечения или диагностирования таупатий, таких как болезнь Альцгеймера (AD) или прогрессирующий надъядерный паралич (PSP).

Эти и другие цели, как они будут видны из последующего описания, приведенного далее, достигаются посредством объекта изобретения по независимым пунктам формулы изобретения. Некоторые из конкретных аспектов и вариантов их осуществления, предполагаемых настоящим раскрытием, составляют объект изобретения по зависимым пунктам формулы изобретения. Другие аспекты и варианты их осуществления, как предусмотрено настоящим раскрытием, можно брать из последующего описания.

В первом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 2 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 3 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 4 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 5 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и/или CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 6 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей.

Во втором аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

переменную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 7 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

переменную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 8 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

В третьем аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

переменную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 9 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

переменную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 10 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

В четвертом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, аминокислотные остатки S238, A239, S241, T245, A246 из SEQ ID NO: 35.

В качестве варианта осуществления первого и четвертого аспекта раскрытие предусматривает моноклональные антитела или их связывающие фрагменты, которые могут представлять собой химерные, гуманизированные или полностью человеческие антитела или их связывающие фрагменты.

В качестве варианта осуществления второго аспекта раскрытие предусматривает моноклональные антитела или их связывающие фрагменты, которые могут представлять собой химерные антитела или их связывающие фрагменты.

В качестве варианта осуществления третьего аспекта раскрытие предусматривает моноклональные антитела или их связывающие фрагменты, которые могут представлять собой гуманизированные антитела или их связывающие фрагменты.

В пятом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент конкурирует за связывание с Тау с Тау-связывающим антителом или его связывающим фрагментом по любому из аспектов с первого до четвертого и их вариантам осуществления.

В шестом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается по существу с тем же эпитопом Тау, что и Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из аспектов с первого до четвертого и их вариантам осуществления.

В качестве варианта осуществления пятого и шестого аспекта раскрытие предусматривает моноклональные антитела или их связывающие фрагменты, которые могут представлять собой гуманизированные антитела или их связывающие фрагменты.

Антитела и их связывающие фрагменты по аспектам с первого до шестого и их вариантам осуществления способны связываться с растворимыми формами Тау человека, парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека или как с растворимыми формами Тау человека, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

В седьмом аспекте настоящее раскрытие предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, такие как последовательности ДНК, кодирующие антитела и связывающие фрагменты по аспектам с первого до шестого и их вариантам осуществления.

В восьмом аспекте настоящее раскрытие предусматривает клонирующие или экспрессирующие векторы, содержащие эти указанные выше молекулы нуклеиновой кислоты.

В девятом аспекте настоящее раскрытие предусматривает клетки-хозяева, содержащие эти вышеуказанные молекулы нуклеиновой кислоты, клонирующие векторы или экспрессирующие векторы.

В десятом аспекте настоящее раскрытие предусматривает способы получения антител и их связывающих фрагментов по аспектам с первого до шестого и их вариантам осуществления.

Одиннадцатый аспект раскрытия относится к использованию антител и их связывающих фрагментов по аспектам с первого до шестого и их вариантам осуществления для лечения таупатий, в частности, таких как AD и PSP.

Другой аспект раскрытия относится к использованию антител и их связывающих фрагментов по аспектам с первого до шестого и их вариантам осуществления для диагностирования таупатий, в частности, таких как AD и PSP.

Описание фигур

Фиг. 1: А) изображена донорная VL из AB1 (VL_AB1) с SEQ ID NO: 7, где подчеркнуты CDR 1 (SEQ ID NO: 1), 2 (SEQ ID NO: 2) и 3 (SEQ ID NO: 3); В) изображена последовательность VL акцепторной области IGKV2-29 человека с SEQ ID NO: 31, где подчеркнуты акцепторные CDR 1, 2 и 3; С) изображена последовательность gVL3_AB1 SEQ ID NO: 9 с пересаженными CDR, где подчеркнуты CDR 1 (SEQ ID NO: 1), 2 (SEQ ID NO: 2) и 3 (SEQ ID NO: 3).

Фиг. 2: А) изображена донорная VH из AB1 (VH_AB1) с SEQ ID NO: 8, где подчеркнуты CDR 1 (SEQ ID NO: 4), 2 (SEQ ID NO: 36) и 3 (SEQ ID NO: 6); В) изображена последовательность VH акцепторной областиIGHV4-59 человека с SEQ ID NO: 32, где подчеркнуты акцепторные CDR 1, 2 и 3; С) изображена последовательность gVH17_AB1 SEQ ID NO: 12 с пересаженными CDR, где подчеркнуты CDR 1 (SEQ ID NO: 4), 2 (SEQ ID NO: 37) и 3 (SEQ ID NO: 6). Донорные остатки показаны курсивным начертанием и выделены: M48. Мутации в каркасе выделены (E1). CDR2 содержит замену S61A по сравнению с VH_AB1. D) изображена последовательность gVH18_AB1 SEQ ID NO: 13 с пересаженными CDR, где подчеркнуты CDR 1 (SEQ ID NO: 4), 2 (SEQ ID NO: 38) и 3 (SEQ ID NO: 6). Донорные остатки показаны курсивным начертанием и выделены (M48). Мутации в каркасе выделены (E1). CDR2 содержит замену S61T по сравнению с VH_AB1.

Фиг. 3: диаграмма, иллюстрирующая анализ агрегирования клеток в эксперименте 3.1.

Фиг. 4: эффект Тау-связывающих антител, имеющих легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 18 (А), и Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 17 (В), или отрицательного контрольного антитела IgG4 A33 (С) в анализе Тау агрегирования клеток с использованием патологических фибрилл Тау человека, полученных от пациентов-людей с AD (AD-PHF8) в качестве затравок.

Фиг. 5: Вестерн-блоттинг, демонстрирующий связывающие свойства Тау-связывающего антитела AB1, имеющего VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8 (А), и гуманизированных антител, имеющих легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 17 (В), Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 18 (С), с Тау, извлеченным из образцов фракции 8 от человека с AD, PSP или контрольных пациентов. Антитело A33 использовали в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 6: наложение термограмм для Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 17, Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 18, Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 54, и Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 55.

Фиг. 7: ДНК-конструкция, кодирующая изоформу 2 Тау человека для экспрессии в *E. coli* (pET 6His TEV-hTau iso 2 (1-441)) (BioReg ID: D0003105) (SEQ ID NO: 39). Вставку BamHI/XhoI, кодирующую аминокислотную последовательность, субклонировали в модифицированный вектор pET32, разрезанный с помощью BamHI/XhoI. (кодирующая последовательность 6His-TEV-Тау представлена в полужирном курсивном начертании).

Фиг. 8: А) экспрессированная аминокислотная последовательность с pET 6His TEV-hTau iso 2 (1-441) (SEQ ID NO: 40); В) конечная аминокислотная последовательность, экспрессированная с pET 6His

TEV-hTau iso 2 (1-441), после TEV расщепления (SEQ ID NO: 41).

Фиг. 9: ДНК конструкция, кодирующая изоформу 3 Тау человека для экспрессии в *E. coli* (pET 6His TEV-hTau iso 3 (1-383)) (BioReg ID: D0003104) (SEQ ID NO: 42). Вставку BamHI/XhoI, кодирующую аминокислотную последовательность, субклонировали в модифицированный вектор pET32, разрезанный с помощью BamHI/XhoI. (кодирующая последовательность 6His-TEV-Тау представлена в полужирном курсивном начертании).

Фиг. 10: А) экспрессированная аминокислотная последовательность с pET 6His TEV-hTau iso 3 (1-383) (SEQ ID NO: 43); В) конечная аминокислотная последовательность, экспрессированная с pET 6His TEV-hTau iso 3 (1-383) после TEV расщепления (SEQ ID NO: 44).

Фиг. 11: ДНК конструкция, кодирующая изоформу 4 Тау человека для экспрессии в *E. coli* (pET 6His TEV-hTau iso 4 (1-352)) (BioReg ID: D0003093) (SEQ ID NO: 45). Вставку BamHI/XhoI, кодирующую аминокислотную последовательность, субклонировали в модифицированный вектор pET32, разрезанный с помощью BamHI/XhoI. (кодирующая последовательность 6His-TEV-Тау представлена в полужирном курсивном начертании).

Фиг. 12: А) Экспрессированная аминокислотная последовательность с pET 6His TEV-hTau iso 4 (1-352) (SEQ ID NO: 46); В) конечная аминокислотная последовательность, экспрессированная с pET 6His TEV-hTau iso 4 (1-352), после TEV расщепления (SEQ ID NO: 47).

Фиг. 13: ДНК конструкция, кодирующая изоформу 5 Тау человека для экспрессии в *E. coli* (pET 6His TEV-hTau iso 5 (1-412)) (BioReg ID: D0003103) (SEQ ID NO: 48). Вставку BamHI/XhoI, кодирующую аминокислотную последовательность, субклонировали в модифицированный вектор pET32, разрезанный с помощью BamHI/XhoI. (кодирующая последовательность 6His-TEV-Тау представлена в полужирном курсивном начертании).

Фиг. 14: А) экспрессированная аминокислотная последовательность с pET 6His TEV-hTau iso 5 (1-412) (SEQ ID NO: 49); В) конечная аминокислотная последовательность, экспрессированная с pET 6His TEV-hTau iso 5 (1-412), после TEV расщепления (SEQ ID NO: 50).

Фиг. 15: ДНК конструкция, кодирующая изоформу 2 Тау человека для экспрессии в клетках HEK293 (pMH-10His-TEV-hTau iso2 (1-441)) (BioReg ID: D0003109) (SEQ ID NO: 51). Вставку BamHI/XhoI, кодирующую аминокислотную последовательность, субклонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих pMH-10HisTEV, разрезанный с помощью BamHI/XhoI. (кодирующая последовательность 10His-TEV-Тау представлена в полужирном курсивном начертании, подчеркнута молчащая точечная мутация A1032T для удаления участка рестрикции).

Фиг. 16: А) экспрессированная аминокислотная последовательность с pMH-10His-TEV-hTau iso2 (1-441) (SEQ ID NO: 52); В) конечная аминокислотная последовательность, экспрессированная с pMH-10His-TEV-hTau iso2 (1-441), после TEV расщепления (SEQ ID NO: 53).

Фиг. 17: эффект Тау-связывающих антител, имеющих легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 18, в анализе Тау агрегирования клеток с использованием патологических фибрилл Тау человека, полученных от пациентов-людей с AD, или пациентов-людей с PSP, или пациентов-людей с FTD, в качестве затравок.

Подробное описание изобретения

Настоящее раскрытие, как иллюстративно описано в дальнейшем, можно подходящим образом реализовать на практике в отсутствие какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не описанным в настоящем описании.

Настоящее раскрытие описано в отношении конкретных аспектов и вариантов его осуществления и со ссылкой на определенные фигуры и примеры, но изобретение ограничено не этим, а только формулой изобретения.

Технические термины используют в их обычном значении, если не указано иное. Если определенным терминам присваивают конкретное значение, определения терминов приведены далее в контексте, в котором термины используют.

Когда термин "содержит" используют в настоящем описании и формуле изобретения, он не исключает другие элементы. Для целей настоящего раскрытия термин "состоит из" считают предпочтительным вариантом осуществления термина "содержит". Если далее в настоящем описании определяют группу, которая содержит, по меньшей мере, определенное число вариантов осуществления, это также следует понимать как раскрытие группы, которая предпочтительно состоит только из этих вариантов осуществления.

Для целей настоящего раскрытия термин "полученный" считают предпочтительным вариантом осуществления термина "допускающий получение". Если далее в настоящем описании, например, антитело определяют как допускающее получение из конкретного источника, это также подлежит понимать как раскрытие антитела, которое получают из этого источника.

Когда используют форму единственного числа, это включает множественное число, пока что-либо еще не будет установлено конкретно. Термин "приблизительно" обозначает интервал точности, понятный специалисту в данной области, который все еще гарантирует технический эффект рассматриваемого признака. Термин обычно указывает на отклонение от приведенного числового значения $\pm 10\%$ и пред-

почтительно $\pm 5\%$.

Следует понимать, что какое-либо упоминание о Тау-связывающем антителе или его связывающем фрагменте в качестве предпочтительного варианта осуществления по различным аспектам предусматривает моноклональные Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты.

Для различных аспектов в настоящем раскрытии отмечены антитела и их связывающие фрагменты, содержащие CDR и переменные области из соответствующих областей легких цепей и/или тяжелых цепей. Антитела или их связывающие фрагменты, содержащие только переменную область легкой цепи или переменную область тяжелой цепи, можно использовать, например, для способов изготовления или, например, для скрининга переменных областей, которые могут эффективно ассоциировать с соответствующей другой переменной областью. Однако следует понимать, что независимо от того, отсылают ли к антителам и их связывающим фрагментам, содержащим CDR и переменные области из соответствующих областей легких цепей и/или тяжелых цепей, это всегда предусматривает в качестве предпочтительного варианта осуществления антитела и их связывающие фрагменты, содержащие CDR и переменные области из соответствующих областей легких цепей и тяжелых цепей.

Как используют в настоящем описании, термины "лечение", "лечить" и т.п. относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим в отношении полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим в отношении частичного или полного излечения заболевания и/или нежелательного эффекта, свойственного заболеванию. Лечение, таким образом, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности у человека, и включает: (а) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но ему еще не поставлен диагноз в качестве имеющего его; (б) ингибирование заболевания, т.е. остановку его развития; и (с) облегчение заболевания, т.е. обеспечение регресса заболевания.

Упоминание о Тау-связывающем антителе или его связывающем фрагменте как о "терапевтически активном средстве" относится к использованию Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента в лечении заболевания.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, которое при введении млекопитающему или другому субъекту для лечения заболевания является достаточным для того, чтобы вызывать такое лечение заболевания. Терапевтически эффективное количество варьирует в зависимости от Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, заболевания и его тяжести и возраста, массы и т.д. субъекта, подлежащего лечению.

Упоминание о Тау-связывающем антителе или его связывающем фрагменте как о "диагностически активном средстве" относится к использованию Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента при диагностировании заболевания.

"Диагностически эффективное количество" относится к количеству Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, которое при использовании в диагностическом тесте на биологическом образце является достаточным для того, чтобы сделать возможной идентификацию заболевания или мониторинг количества больной ткани в качестве средства мониторинга эффекта терапевтического вмешательства.

Настоящая заявка основана отчасти на идентификации антитела, обозначаемого AB1, которое связывает Тау человека. Как принято в данной области, нумерация остатков Тау в этом тексте относится к Тау изоформы 2 с SEQ ID NO: 55 (эталонная последовательность NCBI: NP_005901.2). Как указано далее в настоящем описании, AB1, которое выделяли у иммунизированной крысы, распознает эпитоп, содержащий по меньшей мере аминокислотные остатки S238, A239, S241, T245, A246 из SEQ ID NO: 35. Эта область находится непосредственно перед первой областью повтора MTBR, присутствующей во всех 6 изоформах Тау, которые можно найти в центральной нервной системе.

Примеры показывают, что AB1 способно к связыванию с обеими растворимыми формами Тау человека и парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека (см. пример 2.3), а также, что AB1 способно к обнаружению интранейрональных нейрофибрилярных клубков (NFT), экстранейрональных NFT, нейритических бляшковидных структур и нейропильных нитей на криосрезах образцов человека (см. пример 3.2). В некоторых из анализов и моделей тестируемое AB1 демонстрировало более низкую IC₅₀, чем антитела известного уровня техники. Кажется обоснованным допущение о том, что эти свойства по меньшей мере отчасти опосредованы определяющими комплементарными областями (CDR) переменной области легкой цепи (VL) и переменной области тяжелой цепи (VH) AB1.

В этой связи настоящее раскрытие предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие CDR или определяющие специфичность остатки области VL в AB1 (SEQ ID NO: 7) и/или CDR области VH в AB1 (SEQ ID NO: 8).

Остатки в переменных доменах антитела стандартно нумеруют в соответствии с системой, разработанной Kabat et al. Эта система изложена в Kabat et al., 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (далее "Kabat et al. (выше)"). Эту систему нумерации используют в настоящем описании за исключением того, где это иначе указано.

Обозначения остатков по Kabat не всегда соответствуют непосредственно линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше или дополнительные аминокислоты, нежели в строгой нумерации по Kabat, которые соответствуют укорочению или inserции в структурном компоненте, будь то каркас или определяющая комплементарность область (CDR), базовой структуры переменного домена. Правильную нумерацию остатков по Kabat можно определять для данного антитела посредством выравнивания гомологичных остатков последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, нумерованной по Kabat. Однако в соответствии с Chothia (Chothia, C. and Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), петля, эквивалентная CDR-H1, идет от остатка 26 к остатку 32.

CDR1, CDR2 и CDR3 из VL из AB1, таким образом, идентифицировали как соответствующие SEQ ID NO: № 1, 2 и 3 соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 из VH из AB1, таким образом, идентифицировали как соответствующие SEQ ID NO: № 4, 36 и 6 соответственно. Общеизвестно, что одну или несколько замен, добавлений и/или делеций аминокислот можно создавать в CDR, предусмотренных настоящим раскрытием изобретения без значительного изменения способности антитела связываться с Тау. Эффект каких-либо замен, добавлений и/или делеций аминокислот может легко тестировать специалист в данной области, например, с использованием способов, которые описаны в примерах или известны из общедоступных знаний. В исходно идентифицированной CDR2 в VH (CDRH2), а именно SEQ ID NO: 36, например, потенциальный участок дезамидирования аспарагина идентифицировали и модифицировали посредством замены смежного остатка серина на аланин или треонин. Это давало к последовательности SEQ ID NO: 37 и 38 соответственно, для CDRH2. С целью лаконичности три последовательности для CDRH2, а именно SEQ ID NO: № 36, 37 и 38, комбинировали в виде SEQ ID NO: 5.

Следует принимать во внимание, что дополнительные модификации, такие как замены, добавления и/или делеций, можно создавать в CDR, по существу, не изменяя, например, связывающие свойства по сравнению с AB1. В первую очередь этого можно достигать, например, посредством замены аминокислот в CDR на схожие аминокислоты. "Сходство", как используют в настоящем описании, указывает на то, что, в каком-либо конкретном положении в выровненных последовательностях, аминокислотный остаток относится к схожему типу между последовательностями. Например, лейцином можно заменять изолейцин или валин. Другие аминокислоты, которые часто могут быть заменены на другие, включают, но не ограничиваясь этим:

- фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи);
- лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);
- аспартат и глутамат (аминокислоты, имеющие кислые боковые цепи);
- аспарагин и глутамин (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи);
- цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие серусодержащие боковые цепи).

В этой связи раскрытие предусматривает в одном из аспектов выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 2 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 3 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 4 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 5 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и/или CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 6 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей.

"Идентичность", как используют в настоящем описании, указывает на то, что в каком-либо конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток идентичен между последовательностями. Степень идентичности можно легко вычислять, например, с использованием программного обеспечения BLAST™, которое доступно в NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. k. Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

Идентичность CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 по отношению к SEQ ID NO: № 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно может составлять по меньшей мере 90%, но также может быть выше, например, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99%, причем необязательно предпочтительны более высокие идентичности. Положения другой идентичности можно выбирать в соответствии с соображениями сходства.

В этом контексте раскрытие, в частности, предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: № 1, 2, 3 соответственно, и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO: № 4, 5 и 6 соответственно. Раскрытие также предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: № 1, 2, 3, соответственно, и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID

NO: № 4, 36 и 6, соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: № 1, 2, 3 соответственно, и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO: № 4, 37 и 6 соответственно, и Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: № 1, 2, 3 соответственно, и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO: № 4, 38 и 6 соответственно.

Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, как предусмотрено указанным первым аспектом, могут содержать эти CDR, встроенные в каркасные области из другого источника. Таким образом, CDR могут содержаться в исходных каркасных областях AB1, а именно область VL крысы SEQ ID NO: 7 и область VH крысы SEQ ID NO: 8. Однако CDR также можно встраивать в каркасные области, происходящие от других биологических видов, такие как каркасные области мыши или человека. В зависимости от источника каркасных областей и константных областей, которые можно комбинировать с такими каркасными областями, можно получать химерные, гуманизированные или полностью человеческие Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты.

Химерные Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты могут содержать CDR в каркасных областях из источника, не относящегося к человеку, в комбинации с константными областями из источника человека. Гуманизированные Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты могут содержать CDR в каркасных областях из источника человека в комбинации с константными областями из источника человека.

В этой связи раскрытие предусматривает в другом аспекте выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 7 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 8 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

Идентичность VL и VH по отношению к SEQ ID NO: № 7 и 8 соответственно может составлять по меньшей мере 80%, но также может быть выше, например, по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%, причем необязательно предпочтительны более высокие идентичности. Положения другой идентичности можно выбирать в соответствии с соображениями сходства. Следует принимать во внимание, что в отношении идентичности может быть больше гибкости для каркасных областей по сравнению с CDR.

В этом контексте раскрытие, в частности, предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8.

Настоящим раскрытием, в частности, предусмотрены гуманизированные Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты.

С этой целью CDR можно пересаживать в каркасные области человека. Следует принимать во внимание, что идентификации такого гуманизированного Тау-связывающего антитела с пересаженными CDR или его связывающего фрагмента можно достигать, следуя общепринятым подходам в данной области. Когда пересаживают CDR или определяющие специфичность остатки, можно использовать любую подходящую акцепторную каркасную последовательность вариабельной области человека, учитывая класс/тип донорного антитела, из которого получают CDR (см., например, Cabilly et al., патент США № 4816567; Cabilly et al., европейский патент № 0125023 B1; Boss et al., патент США № 4816397; Boss et al., европейский патент № 0120694 B1; Neuberger, M. S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., европейский патент № 0194276 B1; Winter, патент США № 5225539; Winter, европейский патент № 0239400 B1; Padlan, E. A. et al., европейскую патентную заявку № 0519596 A1).

Также в вариабельной области антитела с пересаженными CDR по настоящему изобретению каркасные области не обязаны иметь точно ту же последовательность, что и у акцепторного антитела. Таким образом, CDR можно пересаживать с изменениями каркаса или без них. Введение изменений каркаса на основании сравнения между каркасными областями донорных вариабельных областей и акцепторных каркасных областей может позволять сохранять, например, аффинность антитела, которая иначе может быть снижена вследствие гуманизации. Например, редкие остатки можно изменять на более часто встречающиеся остатки для этого класса или типа акцепторных цепей. Альтернативно выбранные остатки в акцепторных каркасных областях можно изменять с тем, чтобы они соответствовали остатку, найденному в том же положении в донорном антителе (см. Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Такие изменения следует сохранять на необходимом минимуме, чтобы восстанавливать аффинность донорного антитела. Остатки для изменения можно выбирать, используя протокол, описанный Adair et al. (1991) (Humanised antibodies. WO 91/09967). В антителе с пересаженными CDR по настоящему изобретению акцепторные тяжелую и легкую цепи не обязательно получать из того же антитела, и при желании оно может содержать композитные цепи, имеющие каркасные области, полученные из различных цепей.

Примеры акцепторных каркасов человека, которые можно использовать в настоящем изобретении, представляют собой KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat et al., выше). Например, KOL и NEWM можно использовать для тяжелой цепи, REI можно использовать для легкой цепи и EU, LAY и POM можно использовать как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи. Альтернативно можно использо-

вать последовательности зародышевой линии человека; они доступны по адресу: <http://vbase.mrc-se.cam.ac.uk/> или <http://www.imgt.org>). Настоящее раскрытие, в частности, предусматривает использование V-области IGKV2-29 человека плюс J-области JK2 SEQ ID NO: 31 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) в качестве акцепторной каркасной области для CDR легкой цепи и V-области IGHV4-59 человека плюс J-области JH3 SEQ ID NO: 32 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) в качестве акцепторной каркасной области для CDR тяжелой цепи. В SEQ ID NO: 32 положения 1 и 48, например, можно рассматривать для изменения остатков в каркасных областях. Остаток глутамина в положении 1 можно изменять на глутамат или аспарат. Остаток изолейцина в положении 48 можно изменять на метионин. Другие положения в SEQ ID NO: 32 для изменения остатков в каркасных областях могут представлять собой положения 37 и/или 71. Например, остаток изолейцина в положении 37 в SEQ ID NO: 32 можно изменять на валин. Остаток валина в положении 71 можно изменять на аргинин. Положения в SEQ ID NO: 31 для изменения остатков в каркасных областях могут представлять собой положение 68. Остаток серина в положении 68 в SEQ ID NO: 31 можно изменять на изолейцин.

В этой связи раскрытие предусматривает в другом аспекте выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 9 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 10 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

Такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 9 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 11, 12, 13 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

Идентичность VL и VH и SEQ ID NO: № 9 и 10 соответственно может составлять по меньшей мере 80%, но также может быть выше, например, по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%, причем необязательно предпочтительны более высокие идентичности. Положения другой идентичности можно выбирать в соответствии с соображениями сходства. Следует принимать во внимание, что в отношении идентичности может быть больше гибкости для каркасных областей по сравнению с CDR.

В этом контексте заявка, в частности, предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL SEQ ID NO: 9 и VH SEQ ID NO: 11, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL SEQ ID NO: 9 и VH SEQ ID NO: 12, и Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL SEQ ID NO: 9 и VH SEQ ID NO: 13.

Гуманизированные Тау-связывающие антитела с пересаженными CDR или их связывающие фрагменты могут содержать константные области из источника человека. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей антитела или иммуноглобулины делят на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них дополнительно можно делить на подклассы (субтипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4, IgA1 и IgA2. В частности, можно использовать домены константных областей IgG человека, в частности, изоформ IgG1 и IgG3, когда молекула антитела предназначена для терапевтического использования и необходимы эффекторные функции антитела. Альтернативно можно использовать изоформы IgG2 и IgG4, когда молекула антитела предназначена для терапевтических целей и эффекторные функции антитела не необходимы. Настоящее раскрытие, в частности, предусматривает гуманизированные антитела субтипа IgG1 и IgG4.

Следует принимать во внимание, что также можно использовать дополнения последовательностей этих доменов константных областей. Например, одну или несколько аминокислот, например 1 или 2 замены, добавления и/или делеции аминокислот также можно выполнять в константных доменах антитела без значительного изменения способности антитела связываться с Тау. Также можно использовать молекулы IgG4, в которых серин в положении 241 изменен на пролин, как описано в Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (I), 105-108.

Эффекторные функции антитела включают ADCC и CDC. ADCC относится к антителозависимой клеточной цитотоксичности. Для того чтобы определять, способно ли антитело в принципе опосредовать ADCC, ADCC можно измерять *in vitro* с помощью, например, так называемого анализа высвобождения Cr⁵¹, Eu и S³⁵. Клетку-мишень, содержащую антиген, представляющий интерес, т.е. Тау, можно метить этими соединениями. После связывания терапевтического антитела клетки промывают и эффекторные клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы, такие как FcγRIII, совместно инкубируют с клетками-мишенями, мечеными антителом, и можно осуществлять мониторинг лизиса клеток-мишеней по высвобождению меток. В другом подходе используют так называемый анализ aCella TOX™. CDC относится к комплемент-зависимой клеточной цитотоксичности. Для того чтобы определять, способно ли антитело в принципе опосредовать CDC, CDC можно измерять *in vitro* (как описано, например, в Delobel A et al., *METHODS Mol Biol.* (2013); 988:115-43 или в *Current Protocols in Immunology*, Chapter 13 Comple-

ment, Print ISSN: 1934-3671).

В этой связи раскрытие предусматривает в другом аспекте выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 14 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 15 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей.

Такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать

легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 14, или

последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 16, 17, 18 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные им.

Идентичность легкой цепи и тяжелой цепи по отношению к SEQ ID NO: № 14 и 15 соответственно может составлять по меньшей мере 70%, но также может быть выше, например, по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%, причем необязательно предпочтительны более высокие идентичности. Положения другой идентичности можно выбирать в соответствии с соображениями сходства. Следует принимать во внимание, что в отношении идентичности может быть больше гибкости для каркасных областей по сравнению с CDR и еще больше гибкости для константных областей.

В этом контексте заявка, в частности, предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 16, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 17, и Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 18.

Кроме того, раскрытие предусматривает в другом аспекте выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 14, или

последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 55 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные им.

Идентичность легкой цепи и тяжелой цепи по отношению к SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: № 54 или 55 соответственно может быть по меньшей мере 70%, но также может быть выше, например, по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%, причем необязательно предпочтительны более высокие идентичности. Положения другой идентичности можно выбирать в соответствии с соображениями сходства. Следует принимать во внимание, что в отношении идентичности может быть больше гибкости для каркасных областей по сравнению с CDR и еще больше гибкости для константных областей.

Также настоящее раскрытие предусматривает конкретную область или эпитоп Тау человека, которые связывает антитело или его связывающий фрагмент, предусмотренные настоящим раскрытием, в частности, антитело или его связывающий фрагмент, содержащие какую-либо одну из CDR-H1 (SEQ ID NO: 4), CDR-H2 (SEQ ID NO: 5), CDR-H3 (SEQ ID NO: 6), CDR-L1 (SEQ ID NO: 1), CDR-L2 (SEQ ID NO: 2) или CDR-L3 (SEQ ID NO: 3), например антитела, содержащие VL SEQ ID NO: 7 и VL SEQ ID NO: 8.

Кроме того, настоящее раскрытие предусматривает конкретную область или эпитоп Тау человека, в частности эпитоп в пределах аминокислот 235-250 в SEQ ID NO: 35, который связывает антитело или его связывающий фрагмент, предусмотренные в настоящем раскрытии, в частности, антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VL SEQ ID NO: 7 и VL SEQ ID NO: 8.

Эту конкретную область или эпитоп Тау можно идентифицировать любым подходящим способом картирования эпитопов, известным в данной области, в комбинации с каким-либо одним из антител, предусмотренных настоящим раскрытием. Примеры таких способов включают скрининг пептидов различной длины, получаемых из SEQ ID NO: 35, на связывание Тау-связывающих антител или их связывающих фрагментов по настоящему раскрытию с самым маленьким фрагментом, способным специфически связываться с антителом, который содержит последовательность эпитопа, распознаваемого Тау-связывающими антителами или их связывающими фрагментами. Учитывая существование различных изоформ Тау в центральной нервной системе, следует понимать, что любую такую изоформу можно использовать в способах, изложенных в настоящем описании. В конкретном примере можно использовать самую длинную изоформу Тау, т.е. изоформу 2, как определено в SEQ ID NO: 35. Пептиды Тау с SEQ ID NO: 35 можно получать рекомбинантно, синтетически или посредством протеолитического расщепления полипептида Тау. Пептиды, которые связываются с антителом, можно идентифицировать, например, посредством Вестерн-блоттинга или масс-спектрометрического анализа. В другом примере ЯМР спектроскопии или рентгеновскую кристаллографию можно использовать для того, чтобы идентифицировать эпитоп, связываемый Тау-связывающим антителом или его связывающим фрагментом. После идентификации эпитопный фрагмент, который связывается с антителом по настоящему изобретению, можно

использовать, если необходимо, в качестве иммуногена для получения дополнительных антител, которые связывают тот же эпитоп. Кроме того, эпитопный фрагмент, который связывается с антителом по настоящему изобретению, можно использовать для получения белков, которые связываются с тем же эпитопом и, если необходимо, по меньшей мере ингибируют одну биологическую активность Тау, таких как соединения белков или полипептидов, содержащие больше чем 10 аминокислот, которые основаны на белковых каркасах, например, из липокалина ("антикалина"), фибронектина ("аднектины", тринектины), доменов Кунитца, лектина С-типа, трансферрина, гамма-кристаллина, цистеиновых узлов, анкириновых повторов ("DARPin") или белка А, ("аффитела"), как известно в данной области (Tomlinson, 2004; Mosavi et al., 2004; Gill and Damle, 2006; Nilsson and Tolmachev, 2007; Binz et al., 2004). Дополнительно молекулы, которые связывают тот же эпитоп, включают дополнительные органические молекулы, включая пептиды и циклические пептиды, содержащие не больше чем 10 аминокислот, а также пептидомиметики. Пептидомиметики представляют собой соединения, которые основаны на аминокислотных последовательностях, встречающихся в участках белок-белкового взаимодействия, и известны в данной области (Sillerud and Larson, 2005).

В этой связи раскрытие предусматривает в другом аспекте выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере аминокислотные остатки S238, A239, S241, T245, A246 в SEQ ID NO: 35. Весь эпитоп, похоже, расположен в аминокислотах от 232 до 251 в SEQ ID NO: 35. В одном из примеров эпитоп Тау человека, связанный антителом по настоящему изобретению, содержит аминокислоты S238, A239, S241, T245, A246 и один или несколько остатков, выбранных из S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248 и M250, в SEQ ID NO: 35.

В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, аминокислотные остатки S235, S238, A239, K240, S241, Q244, T245 и A246 в SEQ ID NO: 35. В одном из примеров эпитоп Тау человека, связанный антителом по настоящему изобретению, содержит аминокислоты S235, S238, A239, K240, S241, Q244, T245, A246 и один или несколько остатков, выбранных из S237, R242, L243, V248 и M250, в SEQ ID NO: 35.

В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, аминокислотные остатки S235, S237, S238, A239, K240, S241, Q244, T245 и A246 в SEQ ID NO: 35. В одном из примеров эпитоп Тау человека, связанный антителом по настоящему изобретению, содержит аминокислоты S235, S237, S238, A239, K240, S241, Q244, T245, A246 и один или несколько остатков, выбранных из R242, L243, V248 и M250, в SEQ ID NO: 35.

В одном из примеров эпитоп Тау человека, связанный антителом по настоящему изобретению, содержит аминокислотные остатки S235, S237, S238, A239, K240, S241, R242, L243, Q244, T245, A246, V248 и M250 в SEQ ID NO: 35.

Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8, представляют собой репрезентативные Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, связывающиеся с указанными выше эпитопами.

Такие антитела могут представлять собой химерные, гуманизированные или полностью человеческие моноклональные антитела, или их можно использовать для получения химерных, гуманизированных или полностью человеческих моноклональных антител.

В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное нейтрализующее Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное нейтрализующее Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывает эпитоп Тау, содержащий аминокислотные остатки S238, A239, S241, T245, A246 в SEQ ID NO: 35. В одном из примеров эпитоп Тау человека, связанный нейтрализующим антителом по настоящему изобретению, содержит аминокислоты S238, A239, S241, T245, A246 и один или несколько остатков, выбранных из S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248 и M250 в SEQ ID NO: 35.

В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное нейтрализующее Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное нейтрализующее Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, аминокислотные остатки S235, S238, A239, K240, S241, Q244, T245 и A246 в SEQ ID NO: 35. В одном из примеров эпитоп Тау человека, связанный нейтрализующим антителом по настоящему изобретению, содержит аминокислоты S235, S238, A239, K240, S241, Q244, T245 и A246 и один или несколько остатков, выбранных из S237, R242, L243, V248 и M250, в SEQ ID NO: 35.

В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное нейтрализующее Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное нейтрализующее Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, аминокислотные остатки S235, S237, S238, A239, K240, S241, Q244, T245 и A246 в SEQ ID

NO: 35. В одном из примеров эпитоп Тау человека, связанный нейтрализующим антителом по настоящему изобретению, содержит аминокислоты S235, S237, S238, A239, K240, S241, Q244, T245, A246 и один или несколько остатков, выбранных из R242, L243, V248 и M250, в SEQ ID NO: 35.

В одном из примеров, эпитоп Тау человека, связанный нейтрализующим антителом по настоящему изобретению, содержит аминокислотные остатки S235, S237, S238, A239, K240, S241, R242, L243, Q244, T245, A246, V248 и M250 в SEQ ID NO: 35.

Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8, представляют собой репрезентативные нейтрализующие Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, связывающиеся с указанными выше эпитопами.

Такие нейтрализующие антитела могут представлять собой химерные, гуманизированные или полностью человеческие моноклональные антитела, или их можно использовать для получения химерных, гуманизированных или полностью человеческих моноклональных антител.

В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается по существу с тем же эпитопом Тау, что и Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, описанные выше. Связывание с эпитопом можно определять, как описано для картирования эпитопов, например, используя Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, содержащий VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8, в качестве эталона.

Такие антитела могут представлять собой химерные, гуманизированные или полностью человеческие моноклональные антитела, или их можно использовать для получения химерных, гуманизированных или полностью человеческих моноклональных антител.

Также настоящее раскрытие предусматривает Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, которые специфически связываются с областью или эпитопом Тау человека, в частности с эпитопом в пределах аминокислот 235-250 в SEQ ID NO: 35, как определяют посредством гетероядерного одноквантового корреляционного ядерного магнитного резонанса (HSQC NMR).

Такие антитела могут представлять собой химерные, гуманизированные или полностью человеческие моноклональные антитела, или их можно использовать для получения химерных, гуманизированных или полностью человеческих моноклональных антител.

В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент конкурирует за связывание с Тау с Тау-связывающим антителом, описанным выше.

В этом контексте раскрытие, в частности, предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент конкурирует за связывание с Тау с Тау-связывающим антителом или его связывающим фрагментом, содержащим VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8.

Такие антитела могут представлять собой химерные, гуманизированные или полностью человеческие моноклональные антитела, или их можно использовать для получения химерных, гуманизированных или полностью человеческих моноклональных антител.

Конкуренцию за связывание с Тау можно определять по уменьшению связывания антитела или его связывающего фрагмента с Тау по меньшей мере приблизительно на 50%, или по меньшей мере приблизительно на 70%, или по меньшей мере приблизительно на 80%, или по меньшей мере приблизительно на 90%, или по меньшей мере приблизительно на 95%, или по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно на 100% в присутствии эталонного антитела или его связывающего фрагмента, которые могут содержать VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8. Связывание можно измерять с использованием поверхностного плазмонного резонанса на оборудовании BIAcore®, различных технологий обнаружения флуоресценции (например, флуоресцентной корреляционной спектроскопии, флуоресцентной взаимной корреляции, измерения времени жизни флуоресценции и т.д.) или радиоиммунного анализа различных типов или других анализов, используемых для того, чтобы отслеживать связывание антитела молекулой-мишенью.

Термин "Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент" обозначает, что антитело или его связывающие фрагменты специфически связываются с Тау посредством своих переменных областей, т.е. связывают антиген Тау с более высокой аффинностью, чем другие антигены, которые не являются гомологами для Тау. "Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент" связывается с Тау посредством своих переменных областей с аффинностью, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в 10, 20, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 или по меньшей мере в 10^6 раз большей, чем с другими антигенами, которые не являются гомологами Тау. Понятно, что Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, тем не менее, также могут взаимодействовать с другими белками (такими как белок A S. aureus или другие антитела в способах ELISA) через взаимодействия с последовательностями вне переменной области Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов. Не подразумевается, что такие последние связывающие свойства, которые опосредованы последовательностями вне переменных областей Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов, и в частности константными областями Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов, охвачены термином

"Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент". Анализ скрининга для определения специфичности связывания антитела хорошо известен и обычно практикуется в данной области. Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты могут иметь равновесную константу диссоциации (K_D) для аффинности связывания антитела (или его связывающего фрагмента) с его антигеном в наномолярном диапазоне. Таким образом, K_D может быть ниже приблизительно 1×10^{-6} , например приблизительно ниже 5×10^{-7} , например приблизительно 2×10^{-7} или ниже, и ее можно измерять с использованием, например, поверхностного плазмонного резонанса и устройства BIAcore, как описано в примерах.

Как указано выше, настоящее раскрытие предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты.

Полноразмерное антитело содержит константный домен и переменную область. Константная область не обязана присутствовать в своем полном размере в антигенсвязывающем фрагменте антитела. Однако следует понимать, что независимо от того, рассмотрено ли в заявке использование антител, опосредующих ADCC и/или CDC, связывающий фрагмент должен содержать константную область достаточной длины, чтобы оставаться способным опосредовать ADCC и/или CDC.

Как указано выше, настоящее раскрытие также относится к связывающим Тау человека антителам или их связывающим фрагментам, которые можно создавать в качестве альтернативы гуманизации. Например, возможно получать трансгенных животных (например, мышей), которые способны, после иммунизации, продуцировать полный репертуар антител человека в отсутствие образования эндогенных мышиных антител. Например, описано, что гомозиготная делеция гена соединительной области тяжелой цепи антитела (JH) у химерных и герминативных мутантных мышей ведет к полному ингибированию образования эндогенных антител. Перенос массива генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека таким герминативным мутантным мышам ведет к образованию антител человека со специфичностью к конкретному антигену после иммунизации трансгенного животного, несущего гены иммуноглобулинов зародышевой линии человека, указанным антигеном. Технологии получения таких трансгенных животных и технологии выделения и продуцирования антител человека у таких трансгенных животных известны в данной области (Lonberg, 2005; Green, 1999; Kellermann and Green, 2002; Nicholson et al., 1999). Альтернативно у трансгенного животного, например мыши, только гены иммуноглобулинов, кодирующие переменные области антитела мыши, заменяют на соответствующие последовательности переменных генов иммуноглобулинов человека. Гены иммуноглобулинов зародышевой линии мыши, кодирующие константные области антител, остаются без изменений. Таким образом, эффекторные функции антитела в иммунной системе трансгенной мыши и, следовательно, развитие В-клеток по существу не изменены, что может вести к усовершенствованному образованию антител после антигенного стимула *in vivo*. Когда гены, кодирующие конкретное антитело, представляющее интерес, выделены у таких трансгенных животных, гены, кодирующие константные области, можно заменять на гены константных областей человека для того, чтобы получать полностью человеческое антитело. Другие способы получения фрагментов антител из антител человека *in vitro* основаны на технологиях дисплеев, таких как технология фагового дисплея или рибосомного дисплея, в которых используют библиотеки рекомбинантных ДНК, которые создают, по меньшей мере, отчасти искусственно или из донорских репертуаров генов переменных (V) доменов иммуноглобулинов. Технологии фаговых и рибосомных дисплеев для создания антител человека хорошо известны в данной области (Winter et al., 1994; Hoogenboom, 2002; Kretzschmar and von Ruden, 2002; Groves and Osbourn, 2005; Dufner et al., 2006).

Антитела человека также можно создавать из выделенных В-клеток человека, которые иммунизируют *ex vivo* антигеном, представляющим интерес, и впоследствии сливают для того, чтобы создавать гибридомы, для которых затем можно осуществлять скрининг оптимального антитела человека (Grasso et al., 2004; Li et al., 2006).

Термин "Тау-связывающее антитело" или его связывающий фрагмент, как используют в настоящем описании, относится к антителу или его связывающему фрагменту, который связывается с и ингибирует по меньшей мере одну биологическую активность Тау. Биологические активности Тау известны в данной области и включают, но не ограничиваясь этим, агрегирование молекул Тау с образованием агрегатов различных типов, таких как клубки или фибриллы, описанные выше. В конкретном варианте осуществления "нейтрализующее Тау-связывающее антитело" или его связывающий фрагмент, как используют в настоящем описании, относится к антителу или его связывающему фрагменту, которые связывают Тау и ингибируют его агрегирование в анализе *in vitro*, например таком как анализ *in vitro*, как описано далее в эксперименте 3.1.

Термин "антитело", как используют в настоящем описании, в целом относится к интактным (целым, полноразмерным) антителам, т.е. содержащим элементы двух тяжелых цепей и двух легких цепей. Антитело может содержать другие дополнительные связывающие домены, например молекулу DVD-Ig, как раскрыто в WO 2007/024715, или так называемое (FabFv)₂Fc, описанное в WO 2011/030107. Таким образом, антитело, как используют в настоящем описании, включает би-, три- или тетравалентные полноразмерные антитела.

Связывающие фрагменты антител включают одноцепочечные антитела (т.е. полноразмерные тяже-

лые цепи и легкие цепи); Fab, модифицированные Fab, Fab', модифицированные Fab', F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, Fab-scFv, Fab-scFc, Fab-scFv, стабилизированные дисульфидными мостиками, однодоменные антитела (например, VH или VL или VHH), scFv, scFv-scFc, dsccFv, dsccFv-scFc, би-, три- или тетравалентные антитела, Bis-scFv, диатела, триатела, триатела, тетратела, доменные антитела (dAb), такие как sdAb, фрагменты VHH и VNAR и эпитопсвязывающие фрагменты любого указанного выше (см., например, Holliger and Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online* 2(3), 209-217). Способы создания и изготовления этих фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Формат Fab-Fv впервые раскрыт в WO 2009/040562, а его версии, стабилизированные дисульфидными мостиками, Fab-dsFv, впервые раскрыты в WO 2010/035012. Форма Fab-scFv, стабилизированная дисульфидными мостиками, описана в WO 2013/068571. Форматы антител, включая форматы scFc, впервые описаны в WO 2008/012543. Другие фрагменты антител для использования в настоящем изобретении включают фрагменты Fab и Fab', описанные в международных патентных заявках WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171.

Поливалентные антитела могут содержать несколько специфичностей, например, могут быть биспецифическими, или могут быть моноспецифическими (см., например, WO 92/22583 и WO 05/113605). Один такой пример последнего представляет собой Tri-Fab (или TEM), как описано в WO 92/22583.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен фрагмент Fab.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен фрагмент Fab'.

Типичная молекула Fab' содержит пару из тяжелой и легкой цепей, в которой тяжелая цепь содержит переменную область VH, константный домен CH1 и природную или модифицированную шарнирную область, а легкая цепь содержит переменную область VL и константный домен CL.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен димер Fab' в соответствии с настоящим раскрытием, чтобы создавать F(ab')₂, например димеризация может происходить через шарнир.

В одном из вариантов осуществления антитело или его связывающий фрагмент содержит связывающий домен. Связывающий домен в целом должен содержать 6 CDR, три из тяжелой цепи и три из легкой цепи. В одном из вариантов осуществления CDR находятся в каркасе и вместе формируют переменную область. Таким образом, в одном из вариантов осуществления антитело или связывающий фрагмент содержит связывающий домен со специфичностью к антигену, содержащий переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи.

Следует принимать во внимание, что аффинность Тау-связывающих антител или их связывающих фрагментов, предусмотренных настоящим раскрытием, можно изменять с использованием подходящих известных в данной области способов. Настоящее раскрытие, следовательно, также относится к вариантам молекул антител по настоящему изобретению, которые обладают усовершенствованной аффинностью к Тау. Такие варианты можно получать с помощью множества протоколов созревания аффинности, включая введение мутаций в CDR (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), перетасовку цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), использование штаммов-мутаторов *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), перетасовку ДНК (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), фаговый дисплей (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) и ПЦР с имитацией полового размножения (Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (выше) рассматривают эти способы созревания аффинности.

Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, таким образом, также могут охватывать какие-либо, например, из приведенных выше конкретно отмеченных аминокислотных последовательностей легких или тяжелых цепей с одной или несколькими консервативными заменами (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 консервативными заменами). Можно определять положения в аминокислотной последовательности, которые являются кандидатами на консервативные замены, и можно выбирать синтетические и встречающиеся в природе аминокислоты, которые обеспечивают консервативные замены для каких-либо конкретных аминокислот. Соображения для выбора консервативных замен включают контекст, в котором выполняют какую-либо конкретную замену аминокислоты, гидрофобность или полярность боковой цепи, общий размер боковой цепи, и значение pK боковых цепей с кислой или основной характеристикой при физиологических условиях. Например, лизин, аргинин и гистидин часто подходящим образом заменяют друг друга. Как известно в данной области, это обусловлено тем, что все три аминокислоты имеют основные боковые цепи, тогда как значение pK для боковых цепей лизина и аргинина значительно ближе друг к другу (приблизительно 10 и 12), чем к гистидину (приблизительно 6). Аналогичным образом глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин часто подходящим образом заменяют друг друга, при условии, что глицин часто не подходит для замены других элементов группы. Другие группы аминокислот, часто подходящим образом заменяющих друг друга, включают, но не ограничиваясь этим, группу, состоящую из глутаминовой и аспарагиновой кислот; группу, состоящую из фенилаланина, тирозина и триптофана; и группу, состоящую из серина, треонина и необязательно тирозина.

Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, как они упомянуты в контексте настоящего изобретения, могут охватывать производные образцовых антител, фрагментов и последовательно-

стей, описанных в настоящем описании.

"Производные" включают Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, которые химически модифицированы. Примеры химической модификации включают ковалентное прикрепление одного или нескольких полимеров, таких как водорастворимые полимеры, N-связанные или O-связанные углеводы, сахара, фосфаты и/или другие такие молекулы, такие как поддающиеся обнаружению метки, такие как флуорофоры.

При желании Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент для использования в настоящем изобретении, таким образом, можно конъюгировать с одной или несколькими эффекторными молекулами. Следует принимать во внимание, что эффекторная молекула может содержать одну эффекторную молекулу или две или больше таких молекул, связанных так, чтобы формировать единую частицу, которую можно прикреплять к антителам по настоящему изобретению. Когда желательно получать фрагмент антитела, связанный с эффекторной молекулой, его можно получать посредством стандартных химических процедур или процедур с рекомбинантной ДНК, в которых фрагмент антитела связывают, непосредственно или через связывающее средство, с эффекторной молекулой. Способы конъюгирования таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области (см., Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2-е изд., Robinson et al., ред., 1987, стр. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 и Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Эти способы конъюгирования эффекторных молекул могут включать сайт-специфическую конъюгацию или не сайт-специфическую или случайную конъюгацию. Конкретные химические процедуры включают, например, те, которые описаны в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/031581. Альтернативно, когда эффекторной молекулой является белок или полипептид, связь можно создавать с использованием процедур с рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP 0392745. Альтернативно конкретный участок прикрепления эффекторной молекулы можно конструировать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте по изобретению, например, как описано в WO 2008/038024. Кроме того, связывающее средство можно использовать для того, чтобы соединять эффекторную молекулу с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению, например, как описано в WO 2005/113605. Специалисту в данной области будет понятно, что приведенные выше возможности можно использовать самостоятельно или в комбинации.

Термин "эффекторная молекула", как используют в настоящем описании, включает, например, лекарственные средства, токсины, биологически активные белки, например ферменты, другое антитело или фрагменты антител, синтетические или встречающиеся в природе полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, в частности, радиоактивный йодид, радиоизотопы, хелатированные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения, или соединения, которые можно обнаруживать посредством ЯМР или ЭПР спектроскопии. Эффекторная молекула, как используют в настоящем описании, также включает терапевтические средства, такие как химиотерапевтические средства, терапевтические полипептиды, наночастицы, липосомы или терапевтические нуклеиновые кислоты.

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатированные радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu^{177} , висмут 213 , калифорний 252 , иридий 192 и вольфрам 188 /рений 188 ; или лекарственные средства, такие как, но не ограничиваясь этим, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другие эффекторные молекулы включают белки, пептиды и ферменты. Ферменты, представляющие интерес, включают, но не ограничиваясь этим, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Белки, полипептиды и пептиды, представляющие интерес, включают, но не ограничиваясь этим, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста или тканевой активатор плазминогена, тромботическое средство или антиангиогенное средство, например ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологической реакции, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста нервов (NGF) или другой фактор роста, и иммуноглобулины или другие соединения белков или полипептидов, содержащие больше чем 10 аминокислот, которые основаны на белковых каркасах, например, из липокалина ("антикалина"), фибронектина ("аднектины", тринектины), доменов Кунитца, лектина С-типа, трансферрина, гамма-кристаллина, цистеиновых узлов, анкириновых повторов ("DARPin"), доменов Fyn SH3 ("финомеры") или белка А ("аффитела"), как известно в данной области (Tomlinson, 2004; Mosavi et al., 2004; Gill and Damle, 2006; Nilsson and Tolmachev, 2007; Binz et al., 2004; Silacci et al. 2014).

Другие эффекторные молекулы включают пептиды и белки, которые усиливают или облегчают проникновение через гематоэнцефалитический барьер. Например, в WO 2010/043047, WO 2010/063122, WO 2010/063123 или WO 2011/041897 описаны пептиды или полипептиды, которые могут действовать в качестве вектора, способного транспортировать терапевтическую молекулу через гематоэнцефалитический барьер, и способ их конъюгации с терапевтической молекулой. Пептиды и белки, представляющие интерес, в контексте проникновения через гематоэнцефалитический барьер включают, но не ограничива-

ясь этим, пептиды и белки, которые связываются с рецептором гематоэнцефалитического барьера, таким как рецептор трансферрина, рецептор глюкозы, рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста, белок 8, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности, белок 1, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности, и фактор роста, подобный гепаринсвязывающему эпидермаль-ному фактору роста. Альтернативно эффекторная молекула представляет собой фрагмент антитела, тако-го как доменное антитело, антитело верблюдовых или производное антитела акулы (VNAR), который специфически связывается с одним из вышеуказанных рецепторов гематоэнцефалитического барьера.

Другие эффекторные молекулы могут включать поддающиеся обнаружению вещества, которые можно использовать, например, при диагностике. Примеры поддающихся обнаружению веществ вклю-чают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные мате-риалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные нуклиды, металлы, испускающие позитроны, такие как те, которые можно использовать в позитронно-эмиссионной томографии или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов. В целом ионы металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в качестве диагностиче-ских средств, см. в патенте США № 4741900. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щело-чную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные материалы включают умбелли-ферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансил-хлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; подходящие био-люминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; и подходящие радиоактив-ные нуклиды включают ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{99}Tc , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{68}Ga и ^{18}F . Эффекторные молекулы кон-кретных типов, подходящие в качестве поддающихся обнаружению веществ, которые можно использо-вать для диагностики, включают электронодефицитные тетразины и транс-циклооктен (ТСО), как описа-но в Wyffels et al. 2014, *Nuclear Medicine and biology* 41 (2014):513-523, где Тау-связывающее антитело по изобретению, соединенное с тетразином, можно вводить и позволять ему достигать максимального за-хвата и достаточного выведения из нецелевых мест, после чего следует последующее введение ТСО или оптимизированного аналога ТСО, меченного подходящим радиоактивным нуклидом, так, что ТСО будет ковалентно связывать тетразин на Тау-связывающем антителе по изобретению, и допускать свое обна-ружение, например, посредством позитронно-эмиссионной томографии или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен Тау-связывающий Fab, Fab' или scFv, связан-ный с радиоактивным нуклидом или тетразином. Связи с радиоактивным нуклидом или тетразином можно создавать через присоединение через какую-либо доступную боковую цепь аминокислоты или функциональную группу концевой аминокислоты, расположенной во фрагменте антитела, например, любую свободную амино-, имино-, тиоловую, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут встречаться в природе во фрагменте антитела, или их можно конструировать во фрагмен-те с использованием способов рекомбинантной ДНК (см., например, US 5219996; US 5667425; WO 98/25971, WO 2008/038024). В одном из примеров Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой модифицированный Fab фрагмент, в котором модификация представляет собой добавление на С-конец его тяжелой цепи одной или нескольких ами-нокислот для того, чтобы сделать возможным присоединение эффекторной молекулы. Подходящим об-разом дополнительные аминокислоты формируют модифицированную шарнирную область, содержа-щую один или несколько остатков цистеина, к которым можно прикреплять эффекторную молекулу. В одном из вариантов осуществления, если радионуклид представляет собой ион металла, такого как ^{111}In , ^{99}Tc , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{64}Cu или ^{68}Ga , его можно связывать с помощью хелатора макроцикла, например, как описа-но Turner et al. (Br. J. Cancer, 1994, 70:35-41; Comparative biodistribution of indium-111-labelled macrocycle chimeric B72.3 antibody conjugates in tumour-bearing mice), в соответствии с чем последний, в свою оче-редь, ковалентно связывают с указанной выше боковой цепью аминокислоты или функциональной груп-пой или группами концевой аминокислоты антитела или фрагмента антитела. В дополнительном вариан-те осуществления последний макроциклический хелатный комплекс со связанным радионуклидом может представлять собой эффекторную молекулу, описанную в WO 05/113605, которая представляет собой часть шшивателя, который шшивает два или больше антител против Тау или их фрагментов.

В другом примере эффекторная молекула может увеличивать время полужизни антитела *in vivo*, и/или снижать иммуногенность антитела, и/или усиливать доставку антитела через эпителиальный барь-ер в иммунную систему. Примеры подходящих эффекторных молекул этого типа включают полимеры, альбумин и альбуминсвязывающие белки или альбуминсвязывающие соединения, такие как те, которые описаны в WO 05/117984.

Когда такая эффекторная молекула представляет собой полимер, она может в целом представлять собой синтетический или встречающийся в природе полимер, например, необязательно замещенный по-лиалкилен с неразветвленной или разветвленной цепью, полиалкениленовый или полиоксипалиленовый полимер или разветвленный или неразветвленный полисахарид, например гомо-или гетерополисахарид.

Конкретные необязательные заместители, которые могут присутствовать на указанных выше синте-

тических полимерах, включают одну или несколько гидроксид-, метильных или метоксигрупп.

Конкретные примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенный, с неразветвленной или разветвленной цепью, поли(этиленгликоль), поли(пропиленгликоль) поли(виниловый спирт) или их производные, в частности, необязательно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль) или его производные.

Конкретные встречающиеся в природе полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

В одном из вариантов осуществления полимером является альбумин или его фрагмент, например сывороточный альбумин человека или его фрагмент.

Размер полимера можно варьировать по желанию, но в целом он находится в диапазоне усредненных молекулярных масс от 500 до 50000 Да, например, от 5000 до 40000 Да, таком как от 20000 до 40000 Да. Размер полимера можно выбирать конкретно, исходя из предполагаемого использования продукта, например, способности к локализации в определенных тканях, таких как головной мозг, или к увеличению времени полужизни в циркуляции (обзор см. в Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким образом, например, где продукт предназначен для того, чтобы покинуть циркуляцию и проникать в ткань.

Подходящие полимеры включают полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль) или, в частности, метоксиполи(этиленгликоль) или его производное, и, в частности, с молекулярной массой в диапазоне приблизительно от 15000 Да приблизительно до 40000 Да.

В одном из примеров антитела для использования в настоящем изобретении прикрепляют к фрагментам поли(этиленгликоля) (ПЭГ). В одном конкретном примере антитело представляет собой Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, и ПЭГ молекулы можно прикреплять через какую-либо доступную боковую цепь аминокислоты или функциональную группу концевой аминокислоты, расположенную во фрагменте антитела, например какую-либо свободную амино-, имино-, тиоловую, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут встречаться естественным образом во фрагменте антитела, или их можно конструировать во фрагменте с использованием способов рекомбинантной ДНК (см., например, US 5219996; US 5667425; WO 98/25971, WO 2008/038024). В одном из примеров Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой модифицированный фрагмент Fab, в котором модификация представляет собой добавление на С-конец его тяжелой цепи одной или нескольких аминокислот для того, чтобы сделать возможным присоединение эффекторной молекулы. Подходящим образом дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или несколько остатков цистеина, к которым можно присоединять эффекторную молекулу. Можно использовать несколько участков для присоединения двух или больше молекул ПЭГ.

Подходящим образом молекулы ПЭГ ковалентно связывают через тиоловую группу по меньшей мере одного остатка цистеина, расположенного во фрагменте антитела. Каждую молекулу полимера, присоединенную к модифицированному фрагменту антитела, можно ковалентно связывать с атомом серы остатка цистеина, расположенного во фрагменте. Ковалентная связь обычно представляет собой дисульфидную связь или, в частности, связь сера-углерод. Когда тиоловую группу используют в качестве точки присоединения, можно использовать надлежащим образом активированные эффекторные молекулы, например селективные тиоловые производные, такие как малеимиды, и цистеиновые производные. Активированный полимер можно использовать в качестве исходного материала при получении модифицированных полимером фрагментов антител, как описано выше. Активированный полимер может представлять собой какой-либо полимер, содержащий тиоловую реакционноспособную группу, такую как α -галогенокарбоновая кислота или сложный эфир, например йодацетамид, имид, например, малеимид, винилсульфон или дисульфид. Такие исходные материалы можно получать коммерчески (например, в Nektar, ранее Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) или можно получать из коммерчески доступных исходных материалов с использованием стандартных химических процедур. Конкретные молекулы ПЭГ включают 20К метокси-ПЭГ-амин (возможно получение в Nektar, ранее Shearwater; Rapp Polymere; и SunBio) и M-PEG-SPA (возможно получение в Nektar, ранее Shearwater).

В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие их переменные легкие и/или тяжелые цепи, и молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CDR1, CDR2 и/или CDR3 их переменных легких и/или тяжелых цепей.

В качестве примера, VL AB1 (SEQ ID NO: 7) можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 19. VH AB1 (SEQ ID NO: 8) можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 20.

Гуманизированную VL SEQ ID NO: 9 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 21. Гуманизированную VH SEQ ID NO: 12 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 22 и гуманизированную VH SEQ ID NO: 13 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 23.

Гуманизированную легкую цепь SEQ ID NO: 14 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 24. Гу-

манизованную тяжелую цепь SEQ ID NO: 17 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 25 и гуманизованную тяжелую цепь SEQ ID NO: 18 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 26. Гуманизованную тяжелую цепь SEQ ID NO: 54 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 56 и гуманизованную тяжелую цепь SEQ ID NO: 55 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 57.

Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты можно кодировать с помощью одной нуклеиновой кислоты (например, одной нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидные последовательности, которые кодируют полипептиды легкой и тяжелой цепей антитела) или с помощью двух или больше отдельных нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует отличающуюся часть антитела или фрагмента антитела. В связи с этим раскрытие предусматривает одну или несколько нуклеиновых кислот, которые кодируют какое-либо из вышеуказанных антител или связывающих фрагментов. Молекулы нуклеиновой кислоты могут представлять собой ДНК, кДНК, РНК и т.п.

Например, последовательности ДНК, кодирующие частично или полностью тяжелую и легкую цепи антитела, можно синтезировать по желанию из определенных последовательностей ДНК или на основании соответствующих аминокислотных последовательностей. ДНК, кодирующие акцепторные каркасные последовательности, широко доступны специалистам в данной области и могут быть легко синтезированы на основании их известных аминокислотных последовательностей.

Стандартные способы молекулярной биологии можно использовать для того, чтобы получать последовательности ДНК, кодирующие молекулу антитела по настоящему изобретению. Желаемые последовательности ДНК можно синтезировать полностью или частично, используя способы синтеза олигонуклеотидов. Способы сайт-специфического мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно использовать в зависимости от ситуации.

Предпочтительно кодирующие последовательности нуклеиновой кислоты функционально связаны с последовательностями, управляющими экспрессией, которые делают возможной экспрессию в прокариотических или эукариотических клетках. Экспрессия указанного полинуклеотида включает транскрипцию полинуклеотида в транскрибируемую мРНК. Регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в эукариотических клетках, предпочтительно в клетках млекопитающих, хорошо известны специалистам в данной области. Обычно они содержат регуляторные последовательности, обеспечивающие инициацию транскрипции, и необязательно сигналы поли-А, обеспечивающие терминацию транскрипции и стабилизацию транскрипта. Дополнительные регуляторные элементы могут включать энхансеры транскрипции и трансляции и/или естественным образом ассоциированные или гетерологичные промоторные области.

Настоящее раскрытие в дополнительном аспекте, таким образом, предусматривает клонирующие или экспрессирующие векторы, содержащие такие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты.

"Вектор" представляет собой какую-либо молекулу или композицию, которая обладает способностью переносить последовательность нуклеиновой кислоты в подходящую клетку-хозяина, где может иметь место, например, синтез кодируемого полипептида. Обычно и предпочтительно вектор представляет собой нуклеиновую кислоту, которая сконструирована с использованием способов рекомбинантной ДНК, которые известны в данной области для встраивания желаемой последовательности нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновую кислоту по изобретению). Экспрессирующие векторы обычно содержат один или несколько из следующих компонентов (если они уже не предусмотрены в молекуле нуклеиновой кислоты): промотор, одна или несколько энхансерных последовательностей, участок начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полная интронная последовательность, содержащая донорный и акцепторный сайт сплайсинга, лидерная последовательность для секреции, участок связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, область полилинкера для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, подлежащий экспрессии, и элемент селективного маркера.

Обычно выбирают векторы, функциональные в клетке-хозяине, в которой вектор будут использовать (вектор совместим с аппаратом клетки-хозяина так, что может происходить амплификация гена и/или экспрессия гена).

Настоящее раскрытие в дополнительном аспекте, таким образом, предусматривает клетки-хозяева, содержащие клонирующие или экспрессирующие векторы, как описано выше, и/или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, как описано выше.

Клетка-хозяин может представлять собой клетку любого типа, способную к трансформации нуклеиновой кислотой или вектором с тем, чтобы продуцировать Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, кодируемые ими. Клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор, можно использовать для продуцирования Тау-связывающего антитела, или его связывающего фрагмента, или его части (например, последовательности тяжелой цепи или последовательности легкой цепи, кодируемой нуклеиновой кислотой или вектором). После введения нуклеиновой кислоты или вектора в клетку клетку культивируют в условиях, подходящих для экспрессии кодируемой последовательности. Затем антитело, антигенсвязывающий фрагмент или часть антитела можно выделять из клетки.

Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические клетки-хозяева (такие как *E. coli*) или

эукариотические клетки-хозяева (такие как клетки дрожжей, клетки насекомого или клетки позвоночного). Клетка-хозяин при культивировании в подходящих условиях экспрессирует антитело или его связывающий фрагмент, которые впоследствии можно собирать из среды для культивирования (если клетка-хозяин секретирует их в среду) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей их (если они не секретируются). Выбор подходящей клетки-хозяина зависит от различных факторов, таких как желаемые уровни экспрессии, модификации полипептидов, которые желательны или необходимы для активности, такие как гликозилирование или фосфорилирование, и легкость укладки в биологически активную молекулу. Выбор клетки-хозяина зависит отчасти от того, подлежит ли антитело или его связывающий фрагмент посттранскрипционной модификации (например, гликозилированию и/или фосфорилированию). Если так, клетки-хозяева дрожжей, насекомых или млекопитающих являются предпочтительными.

Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают CHO, миеломные или гибридные клетки. Клетки яичника китайского хомяка (CHO) подходящих типов для использования в настоящем изобретении могут включать клетки CHO и CHO-K1, включая клетки CHO dhfr-, такие как клетки CHO-DG44 и клетки CHODXB11, и те, которые можно использовать с селективным маркером DHFR, или клетки CHOKI-SV, которые можно использовать с селективным маркером глутаминсинтетазой. Многие доступны в American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Va. Примеры включают клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO) (ATCC № CCL61), клетки эмбриональной почки человека (HEK) 293 или 293T (ATCC № CRL1573), клетки 3T3 (ATCC № CCL92) или клетки PER.C6. Клетки других типов, используемые при экспрессии антител, включают лимфоцитарные клеточные линии, например миеломные клетки NSO и клетки SP2, клетки COS.

Другой аспект настоящего раскрытия предусматривает процесс продуцирования Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, который включает культивирование клетки-хозяина, содержащей, например, вектор, в условиях, подходящих для того, чтобы приводить к экспрессии Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, например, с ДНК, кодирующей Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, и выделение молекулы антитела.

Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать только полипептид тяжелой или легкой цепи, и в этом случае только последовательность, кодирующая полипептид тяжелой цепи или легкой цепи, подлежит использованию для трансфекции клеток-хозяев. Для получения продуктов, содержащих как тяжелые, так и легкие цепи, клеточную линию можно трансфицировать двумя векторами, первый вектор кодирует полипептид легкой цепи и второй вектор кодирует полипептид тяжелой цепи. Альтернативно можно использовать один вектор, вектор содержит последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент антитела и фрагменты в соответствии с настоящим раскрытием экспрессируют на хорошем уровне в клетках-хозяевах. Таким образом, свойства антител и/или фрагментов способствуют коммерческой обработке.

Таким образом, предусмотрен процесс культивирования клетки-хозяина и экспрессии Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, выделения последних и необязательной их очистки для представления выделенного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента. В одном из вариантов осуществления процесс дополнительно включает стадию конъюгации эффекторной молекулы с выделенным антителом или фрагментом, например конъюгации с полимером ПЭГ, в частности, как раскрыто в настоящем описании.

Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент можно составлять в композициях, в частности, фармацевтических или диагностических композициях. Фармацевтические композиции содержат терапевтически или профилактически эффективное количество Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента в смеси с подходящим носителем, например фармацевтически приемлемым средством. Диагностические композиции содержат диагностически эффективное количество Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента в смеси с подходящим носителем, например диагностически приемлемым средством.

Фармацевтически приемлемые средства для использования в данных фармацевтических композициях включают носители, эксципиенты, разбавители, антиоксиданты, консерванты, красящие, ароматизирующие и разбавляющие средства, эмульгирующие средства, суспендирующие средства, растворители, наполнители, объемообразующие средства, буферы, носители для доставки, регулирующие тоничность средства, сорастворители, смачивающие средства, комплексобразующие средства, буферные средства, противомикробные и поверхностно-активные средства.

Композиция может быть в жидкой форме или в лиофилизованной форме и может содержать один или несколько лиопротекторов, эксципиентов, поверхностно-активных средств, высокомолекулярных структурных добавок и/или объемообразующих средств (см., например, патенты США 6685940, 6566329 и 6372716).

Композиции могут подходить для парентерального введения. Образцовые композиции подходят для инъекции или инфузии животному посредством какого-либо пути, доступного квалифицированному работнику, такого как внутрисуставной, подкожной, внутривенной, внутримышечной, интраперитонеальной, интрацеребральной (интрапаренхимальной), интрацеребровентрикулярной, внутримышечной,

внутриглазной, внутриартериальный путь или внутрь повреждения. Парентеральный состав обычно представляет собой стерильный не содержащий пирогенны изотонический водный раствор, необязательно содержащий фармацевтически приемлемые консерванты.

Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактатный раствор Рингера или жирные масла. Внутривенные носители включают восполнители текучих и питательных веществ, восполнители электролитов, такие как те, которые основаны на декстрозе Рингера, и т.п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, например, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства, инертные газы и т.п. См. в целом Remington's Pharmaceutical Science, 16-е изд., ред. Mack, 1980, которое включено в настоящее описание посредством ссылки.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, можно составлять для контролируемой или замедленной доставки таким образом, который обеспечивает локальную концентрацию продукта (например, болюс, эффект депо) и/или увеличенную стабильность или время полужизни в конкретном локальном окружении. Композиции могут включать состав антител, связывающих фрагментов, нуклеиновых кислот или векторов по изобретению с препаратами частиц полимерных соединений, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота и т.д., а также средствами, такими как биоразрушаемая матрица, инъеклируемые микросферы, микрокапсульные частицы, микрокапсулы, биоразрушаемые гранулы, липосомы и имплантируемые устройства доставки, которые обеспечивают контролируемое или замедленное высвобождение активного средства, которое тогда можно доставлять в виде инъекции депо.

Альтернативно или дополнительно композиции можно вводить локально через имплантацию в пораженную область мембраны, губки или другого подходящего материала, в котором абсорбировано или инкапсулировано антитело, связывающий фрагмент, нуклеиновая кислота или вектор по изобретению. Когда используют имплантируемое устройство, устройство можно имплантировать в любую подходящую ткань или орган, и доставка антитела, связывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению может происходить непосредственно через устройство через болюс или через непрерывное введение или через катетер с использованием непрерывной инфузии.

Фармацевтическую композицию, содержащую Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, можно составлять для ингаляции, например, в виде сухого порошка. Ингаляционные растворы также можно составлять в сжиженном пропелленте для аэрозольной доставки. В другом составе раствора можно доставлять с помощью небулайзера.

Один аспект настоящего изобретения относится к использованию Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов в качестве терапевтически активного средства при лечении заболеваний.

Другой аспект настоящего изобретения относится к использованию Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов при лечении таупатий. Таупатии, которые, по описаниям, содержат Тау-включения (Clavaguera et al. Brain Pathology 23 (2013) 342-349), включают болезнь Альцгеймера (AD); амиотрофический боковой склероз/комплекс паркинсонизм-деменция; болезнь аргирофильных зерен; хроническую травматическую энцефалопатию; кортикобазальную дегенерацию; диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией; синдром Дауна; семейную британскую деменцию; семейную датскую деменцию; лобно-височную деменцию и паркинсонизм, сцепленный с хромосомой 17, обусловленный мутациями MAPT; болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера; гваделупский паркинсонизм; миотоническую дистрофию; нейродегенерацию с накоплением железа головном мозге; болезнь Ниманна-Пика, тип С; негуамскую болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками; болезнь Пика; постэнцефалитический паркинсонизм; прионную церебральную амилоидную ангиопатию; прогрессирующий подкорковый глиоз; прогрессирующий надъядерный паралич (PSP); умственную отсталость, связанную с SLC9A6; подострый склерозирующий панэнцефалит; деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков; и таупатию белого вещества с глобулярными глиальными включениями

Другой аспект настоящего раскрытия, таким образом, относится к использованию Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов при лечении болезни Альцгеймера и/или прогрессирующего надъядерного паралича.

Соответственно настоящее раскрытие также относится к способам лечения таупатий, в частности болезни Альцгеймера и/или прогрессирующего надъядерного паралича, посредством введения терапевтически активного количества Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента нуждающемуся в этом субъекту.

Настоящее раскрытие также относится к использованию Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента при изготовлении лекарственного средства для лечения таупатий, в частности болезни Альцгеймера и/или прогрессирующего надъядерного паралича.

В другом аспекте настоящего раскрытия Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент можно использовать отдельно или в комбинации с другими средствами в терапии. Например, Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент можно совместно вводить по меньшей мере с

одним дополнительным терапевтическим средством. В определенных аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой терапевтическое средство, эффективное для лечения другого нарушения или того же, для лечения которого используют Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент. Образцовые дополнительные терапевтические средства включают, но не ограничиваясь этим: ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин, и такрин), антагонисты рецепторов NMDA (такие как мемантин), ингибиторы агрегирования бета-амилоидных пептидов, антиоксиданты, модуляторы γ -секретазы, имитаторы фактора роста нервов (NGF) или генная терапия NGF, агонисты PPAR γ , ингибиторы HMS-CoA редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецепторов GABA, ингибиторы киназы гликогенсинтазы, внутривенный иммуноглобулин, агонисты мускариновых рецепторов, модуляторы никотиновых рецепторов, активную или пассивную иммунизацию бета-амилоидным пептидом, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты рецепторов серотонина и антитела против бета-амилоидного пептида или дополнительные антитела против Тау. Дополнительные образцовые неврологические лекарственные средства можно выбирать из гормона роста или нейротрофического фактора; примеры включают, но не ограничиваясь этим, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-4/5, фактор роста фибробластов (FGF)-2 и другие FGF, нейротрофин (NT)-3, эритропоэтин (EPO), фактор роста гепатоцитов (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF)- α , TGF- β , фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), херегулин, нейрегулин, артемин, персефин, интерлейкины, нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GFR), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (CSF), гранулоцитарно-макрофагальный CSF, нетрины, кардиотрофин-1, хеджехог, ингибирующий лейкемию фактор (LIF), мидкин, плейотрофин, морфогенетические белки кости (BMP), нетрины, сапонины, семафорины, и фактор стволовых клеток (SCF). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство выбирают по его способности смягчать один или несколько побочных эффектов неврологического лекарственного средства. Такие способы комбинированного лечения, отмеченные выше, охватывают комбинированное введение (когда два или больше терапевтических средств включены в один и тот же или отдельные составы) и отдельное введение, в случае которого введение Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адьюванта. Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты также можно использовать в комбинации с другой интервенционной терапией, такой как, но не ограничиваясь этим, лучевая терапия, поведенческая терапия или другая терапия, известная в данной области и подходящая для неврологического нарушения, подлежащего лечению или предотвращению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к использованию Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов в качестве диагностически активного средства.

Один аспект настоящего раскрытия также относится к использованию Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов в диагностике таупатий, в частности болезни Альцгеймера и/или прогрессирующего надъядерного паралича.

Такое диагностическое тестирование предпочтительно можно выполнять на биологических образцах. "Биологический образец" охватывает образцы различных типов, получаемые от индивидуума, которые можно использовать в диагностическом или мониторинговом анализе. Определение охватывает цереброспинальную жидкость, кровь и другие образцы жидкостей биологического происхождения, твердые образцы тканей, такие как биоптаты или тканевые культуры или клетки, получаемые из них, и их потомство. Определение также включает образцы, которыми манипулировали каким-либо образом после их получения, например посредством обработки реактивами, солубилизации или обогащения определенными компонентами, такими как полинуклеотиды. Термин "биологический образец" охватывает клинический образец и также включает клетки в культуре, клеточные супернатанты, клеточные лизаты, сыворотку, плазму, биологическую жидкость и тканевые образцы. Термин "биологический образец" включает мочу, слюну, цереброспинальную жидкость, фракции крови, такие как плазма и сыворотка, и т.п.

Диагностическое тестирование предпочтительно можно выполнять на биологических образцах, которые не находятся в контакте с организмом человека или животного. Такое диагностическое тестирование также обозначают как тестирование *in vitro*.

Диагностическое тестирование *in vitro* может быть основано на способе обнаружения Тау *in vitro* в биологическом образце, полученном у индивидуума, который включает стадии i) контакта биологического образца с Тау-связывающим антителом или его связывающим фрагментом, как раскрыто в настоящем описании; и ii) обнаружение связывания Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, как раскрыто в настоящем описании, с Тау. Посредством сравнения обнаруживаемого уровня Тау с подходящим контролем затем можно диагностировать присутствие или вероятность возникновения таупатии, такой как болезнь Альцгеймера и/или прогрессирующий надъядерный паралич. Такой способ обнаружения, таким образом, можно использовать для того, чтобы определять, имеет ли субъект таупа-

тию или ли риск ее развития, включая определение стадии (тяжести) таупатии.

Настоящее раскрытие, таким образом, предусматривает способ диагностирования таупатии *in vitro*, например болезни Альцгеймера и/или прогрессирующего надъядерного паралича, у субъекта, включающий стадии i) оценки уровня или состояния Тау в биологическом образце, полученном у субъекта, посредством использования Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, как раскрыто в настоящем описании; и ii) сравнения уровня или состояния Тау с эталонным, стандартным или нормальным контрольным значением, которое отражает уровень или состояние Тау у нормальных контрольных субъектов. Значимое различие между уровнем и/или состоянием полипептида Тау в биологическом образце и нормальным контрольным значением указывает на то, что индивидуум имеет таупатию, такую как болезнь Альцгеймера и/или прогрессирующий надъядерный паралич.

В отношении эти различных аспектов и вариантов осуществления, которые описаны в настоящем описании, настоящее раскрытие предусматривает, в частности:

1. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 2 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 3 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 4 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 5 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и/или CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 6 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей.

2. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 1, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 2, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 3; и

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 4, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 5, и/или CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 6.

3. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, в котором X_1 в SEQ ID NO: 5 представляет собой A.

4. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, в котором X_1 в SEQ ID NO: 5 представляет собой T.

5. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3 или 4, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело.

6. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 5, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой химерное, гуманизированное или полностью человеческое антитело.

7. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 6, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело субтипа IgG1 или IgG4.

8. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки A246, A239, S241, T245, S238 в SEQ ID NO: 35.

9. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки S238, A239, S241, T245, A246 и один или несколько остатков, выбранных из S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248 и M250, в SEQ ID NO: 35.

10. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимым Тау человека.

11. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

12. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается как с растворимым человеческим, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

13. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 7 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 8 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

14. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 13, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 7, и
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 8.

15. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 13 или 13, в которых X_1 в SEQ ID NO: 8 представляет собой А.

16. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 13 или 13, в которых X_1 в SEQ ID NO: 8 представляет собой Т.

17. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 13, 14, 15 или 16, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело.

18. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 17, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой химерное антитело.

19. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 13, 14, 15, 16, 17 или 18, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки А246, А239, S241, Т245, S238 в SEQ ID NO: 35.

20. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки S238, А239, S241, Т245, А246 и один или несколько остатков, выбранных из S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248 и M250, в SEQ ID NO: 35.

21. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимым Тау человека.

22. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

23. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается как с растворимым человеческим, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

24. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 9 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 10 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

25. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 24, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 9, и
вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 10.

26. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 24 или 25, в которых X_3 в SEQ ID NO: 10 представляет собой А.

27. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 24 или 25, в которых X_3 в SEQ ID NO: 10 представляет собой Т.

28. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 24, в которых вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 11 или 12.

29. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 24, 25, 26, 27 или 28, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело.

30. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 29, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой гуманизованное антитело.

31. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 30, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент относится к субтипу IgG1 или IgG4.

32. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий

фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки A246, A239, S241, T245, S238 в SEQ ID NO: 35.

33. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки S238, A239, S241, T245, A246 и один или несколько остатков, выбранных из S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248 и M250, в SEQ ID NO: 35.

34. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимым Тау человека.

35. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

36. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается как с растворимым человеческим, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

37. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 14 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 15 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей.

38. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 37, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 14, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 15.

39. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 37 или 38, в которых X_3 в SEQ ID NO: 15 представляет собой A.

40. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 37 или 38, X_3 в SEQ ID NO: 15 представляет собой T.

41. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 37, в которых переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 17 или 18.

42. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 37, 38, 39, 40 или 41, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное гуманизованное антитело.

43. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 42, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент относится к субтипу IgG1 или IgG4.

44. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 37, 38, 39, 40, 41, 42 или 43, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки A246, A239, S241, T245, S238 в SEQ ID NO: 35.

45. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки S238, A239, S241, T245, A246 и один или несколько остатков, выбранных из S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248 и M250, в SEQ ID NO: 35.

46. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимым Тау человека.

47. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

48. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается как с растворимым человеческим, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

49. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки A246, A239, S241, T245, S238 в SEQ ID NO: 35.

50. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 49, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содер-

жащим аминокислотные остатки S238, A239, S241, T245, A246 и один или несколько остатков, выбранных из S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248 и M250, в SEQ ID NO: 35.

51. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 50, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело.

52. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 50 или 51, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой химерное, гуманизованное или полностью человеческое антитело.

53. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 52, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное гуманизованное антитело или его связывающий фрагмент субтипа IgG1 или IgG4.

54. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 50, 51, 52 или 53, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимым Тау человека.

55. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 50, 51, 52 или 53, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

56. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 50, 51, 52 или 53, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается как с растворимым Тау человека, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

57. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент конкурирует за связывание с Тау с Тау-связывающим антителом или его связывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 или 56.

58. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 57, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент конкурирует за связывание с Тау с Тау-связывающим антителом или связывающим фрагментом, содержащим

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 9, и

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 12 или 13.

59. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается по существу с тем же эпитопом Тау, что и Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 или 56.

60. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 59, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается по существу с тем же эпитопом Тау, что и Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент, содержащие

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 9, и

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 12 или 13.

61. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 57, 58, 59 или 60, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело.

62. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 61, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой химерное, гуманизованное или полностью человеческое антитело.

63. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 62, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой гуманизованное антитело субтипа IgG1 или IgG4.

64. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 57, 58, 59, 60, 61, 62 или 63, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки A246, A239, S241, T245, S238 в SEQ ID NO: 35.

65. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки S238, A239, S241, T245, A246 и один или несколько остатков, выбранных из S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248 и M250, в SEQ ID NO: 35.

66. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 или 65, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимым Тау человека.

67. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 или 65, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с парными спиральными филаментами (РНФ) Тау человека.

68. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 или 65, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается как с растворимым человеческим, так и с парными спиральными филаментами (РНФ) Тау человека.

69. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fd и Fv, scFv, Fab-Fv, Fab-scFv, Fab-dsFv, Fab-scFc, scFv-scFc, dsscFv, dsscFv-scFc, диатело, триатело, тетраатело, линейное антитело или VHH-содержащее антитело.

70. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую и/или тяжелую цепь Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 или 69.

71. Клонированный или экспрессируемый вектор, содержащий одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 70.

72. Клетка-хозяин, содержащая одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 70 или один или несколько клонируемых или экспрессируемых векторов по варианту осуществления 71.

73. Клетка-хозяин по варианту осуществления 72, которая не является эмбриональной стволовой клеткой человека.

74. Способ получения Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 или 69, включающий по меньшей мере стадии

а) культивирования клетки-хозяина по варианту осуществления 72 или 73, и

б) выделения указанного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента.

75. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68 для применения в качестве терапевтически активного средства.

76. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68 для использования в лечении таупатии.

77. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент для использования по варианту осуществления 76, где указанная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

78. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент для использования по варианту осуществления 76, где указанная таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич.

79. Способ лечения таупатии, включающий стадию введения Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68 нуждающемуся в этом субъекту.

80. Способ по варианту осуществления 79, в котором указанная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

81. Способ по варианту осуществления 79, в котором указанная таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич.

82. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68 для применения в качестве диагностического средства.

83. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68 для использования в диагностировании таупатии.

84. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент для использования по варианту осуществления 83, где указанная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

85. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент для использования по варианту осуществления 83, где указанная таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич.

Далее изобретение описано в отношении некоторых примеров, которые, однако, не следует толковать в качестве ограничения.

Эксперименты

Эксперимент 1. Создание Тау-связывающих антител.

1.1 Экспрессия рекомбинантного Тау.

Белок Тау человека экспрессировали в двух системах-хозяевах, *E. coli* BL21 (DE3) и клетках HEK293 (линия клеток эмбриональной почки человека). Получали четыре различных изоформы Тау в *E. coli*, изоформы 2, 3, 4 и 5, и одну изоформу в клетках HEK293, изоформу 2. Полная последовательность всех экспрессирующих векторов и полученных белков представлены на фиг. 5-14.

Получение Тау в *E. coli*.

Гены, кодирующие различные изоформы Тау, создавали синтетически и осуществляли оптимизацию кодонов для экспрессии в *E. coli*. Стандартные способы молекулярной биологии использовали для субклонирования в модифицированный вектор pET32, сконструированный для получения Тау с N-концевой меткой 6His-TEV.

Клетки *E. coli* BL 21 (DE3) трансформировали с использованием вышеуказанного вектора и белок экспрессировали с использованием стандартных способов.

Затем клетки *E. coli* извлекали посредством центрифугирования, лизировали и осуществляли захват белка Тау из растворимой фракции посредством аффинной хроматографии с использованием NiNTA (Qiagen). Метку 6His удаляли с использованием TEV протеазы, после чего следовала вторая стадия NiNTA хроматографии. В очищенном Тау проводили замену буфера на подходящие буферы в зависимости от применения. У образцов, созданных для иммунизации, удаляли эндотоксин, используя колонки Proteus NoEndo™ (Vivaproducts).

Создание изотопически меченного Тау для исследований ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Экспрессию белка осуществляли, как описано выше, за исключением того, что минимальные среды использовали для встраивания ¹⁵N, ¹³C и ²H в белок. Лизировали осадки клеток *E. coli* и очищали белок Тау с использованием стадии аффинной хроматографии NiNTA (Qiagen), метку 6His удаляли с использованием TEV протеазы и затем белок Тау очищали посредством гель-фильтрации, используя блок Superdex 200 (GE-Healthcare).

Получение Тау в HEK293.

Гены, кодирующие изоформу 2 Тау, создавали синтетически с использованием ДНК последовательности дикого типа. Стандартные способы молекулярной биологии использовали для их субклонирования в экспрессирующий вектор pMV-10HisTEV (содержащий промотор CMV), сконструированный для получения Тау с N-концевой меткой 10His-TEV (SEQ ID NO: 51).

Получаемый вектор трансфицировали с использованием экспрессирующей системы Expi2 93™ (Invitrogen) по протоколам производителя. В этой системе используют клетки Expi293F человека, полученные из клеточной линии HEK293.

Белок Тау накапливали в средах для культивирования, откуда его извлекали с использованием Ni Sepharose Excel (GE Healthcare) для аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла. Затем метку 10His удаляли с использованием TEV протеазы перед повторным внесением в колонку с Ni Sepharose и сбором отщепленного Тау в протекающей жидкости. В очищенном Тау проводили замену буфер на подходящие буферы, в зависимости от применения.

Формирование фибрилл.

Белок Тау при концентрации 450 мкМ стерилизовали фильтрованием и встряхивали в 1,5 мл пробирке Eppendorf с использованием термосмешивателя (Eppendorf) на 750 об./мин, 37°C в течение 310 ч. Мониторинг формирования фибрилл осуществляли с использованием красителя Thioflavine-T и считывания поглощения на спектрофотометре Fluostar Omega (BMG Labtech). Формирование парных спиральных филаментов (PHF) подтверждали посредством электронной микроскопии с негативным окрашиванием.

1.2 Иммунизация.

10 самок крыс Sprague Dawley (260-280 г) иммунизировали подкожно с использованием 50 мкг рекомбинантного белка Тау, эмульсифицированного в равном объеме полного адьюванта Фрейнда (CFA) посредством энергичного смешивания шприцом. Крысы получали 3 реиммунизирующих инъекции с интервалами 14 суток с использованием неполного адьюванта Фрейнда (IFA), при этом также брали кровь из хвоста. Завершение наступало на 14 сутки после конечной реиммунизации, получали суспензии отдельных клеток селезенки и костного мозга, которые замораживали в 10% диметилсульфоксиде (DMSO) в эмбриональной телячьей сыворотке (FCS) при -80°C. Рекомбинантный белок Тау человека экспрессировали в *E. coli*, очищали и агрегировали *in vitro* перед иммунизацией. Для иммунизации ис-

пользовали конечный образец эквимольной смеси четырех изоформ (2, 3, 4 и 5) Тау, содержащей смесь растворимого Тау и нерастворимого Тау фибрилл.

1.3 Культура В-клеток.

Культуры В-клеток получали с использованием способа, схожего с тем, что описан Zubler et al. (1985). В кратком изложении, В-клетки, полученные из РВМС от иммунизированных крыс, культивировали при плотности приблизительно 3000 клеток на лунку в 96-луночных тканевых культуральных планшетах со штриховыми кодами со средой RPMI 1640 (Gibco BRL) 200 мкл/лунка с добавлением 10% FCS (PAA laboratories ltd), 2% HEPES (Sigma Aldrich), 1% L-глутамин (Gibco BRL), 1% раствора пенициллина/стрептомицина (Gibco BRL), 0,1% β-меркаптоэтанола (Gibco BRL), 3% супернатанта культуры активированных спленоцитов и гамма-облученных мутантных клеток EL4 тимомы мыши (5×10^4 /лунка) в течение семи суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Брали образец приблизительно всего $1,2 \times 10^8$ В-клеток.

1.4 Первичный скрининг.

Присутствие Тау-связывающих антител в супернатантах культур В-клеток определяли с использованием анализа связывания на основе гомогенной флуоресценции с использованием гранул Superavidin™ (Bangs Laboratories), покрытых биотинилированным растворимым или нерастворимым Тау, полученным, как описано в разделе 1.1. Создаваемый Тау имел как растворимую, так и нерастворимую фракцию. Нерастворимый Тау удаляли из смеси через центрифугирование с использованием настольной центрифуги Eppendorf MiniSpin Plus на 14500 об/мин в течение 10 мин. Каждую фракцию биотинилировали отдельно с использованием набора EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation по инструкциям производителя. Растворимую биотинилированную фракцию удаляли из свободного биотина с использованием центрифужных обессоливающих колонок Zeba по инструкциям производителя. Нерастворимую фракцию удаляли из свободного биотина посредством центрифугирования смеси в центрифуге Eppendorf MiniSpin Plus на 14500 об/мин в течение 10 мин, извлечения Тау-содержащего пеллета и его ресуспендирования в 1,5 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), повторяя этот процесс 5 раз. Анализ позволял осуществлять скрининг супернатанта, демонстрирующего связывание с растворимыми или нерастворимыми формами Тау. 10 мкл супернатанта переносили из 96-луночных тканевых культуральных планшетов со штриховыми кодами в 384-луночные аналитические планшеты с черными стенками и штриховыми кодами, содержащими растворимый или нерастворимый Тау, иммобилизованный на гранулах (10 мкл/лунка), с использованием жидкостного манипулятора Matrix Platemate. Связывание обнаруживали с использованием конъюгата козы со специфичностью к Fcγ IgG крысы и Cy5 (Jackson). Планшеты считывали на системе обнаружения клеток Applied Biosystems 8200.

1.5 Вторичный скрининг.

После первичного скрининга положительные супернатанты объединяли в 96-луночных мастер-планшетах со штриховыми кодами, используя робот для точечного переноса Aviso Onyx, и В-клетки в планшетах для клеточных культур замораживали при -80°C. Затем осуществляли скрининг мастер-планшетов в анализе ELISA на растворимой фракции Тау. Это выполняли для того, чтобы определять, в более строгом скрининге, способность антител связывать Тау и проверять, что они не связывали гранулы в первичном скрининге. Анализ ELISA включал покрывание 384-луночных планшетов Maxisorp (ThermoScientific/Nunc) растворимым Тау по 3 мкг/мл в карбонатном покрывающем буфере (dH₂O+0,16% Na₂CO₃+0,3% NaHCO₃). Планшеты блокировали с использованием 1% мас./об. казеина+1% мас./об. BSA в PBS и затем инкубировали с супернатантом культуры В-клеток по 10 мкл/лунка. Вторичное HRP-конъюгированное антитело козы против Fc IgG крысы (Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch) добавляли to the plates, после чего следовала визуализация связывания с использованием субстрата TMB (3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидин, из EMD Millipore; 10 мкл/лунка). Оптическую плотность измеряли на 630 нм с использованием считывателя микропланшетов BioTek Synergy 2. Супернатанты В-клеток, демонстрирующие специфичность к Тау, выбирали для извлечения варибельной области.

1.6 Извлечение варибельной области.

Для того чтобы сделать возможным извлечение генов варибельной области антитела из выбранных лунок, представляющих интерес, осуществлению подлежала стадия деконволюции, чтобы делать возможной идентификацию антиген-специфических В-клеток в данной лунке, которая содержала гетерогенную популяцию В-клеток. Этого достигали с использованием способа флуоресцентного фокуса (Clargo et al., 2014). В кратком изложении, секретирующие иммуноглобулины В-клетки из положительной лунки смешивали со стрептавидиновыми гранулами (New England Biolabs), покрытыми биотинилированным растворимым Тау и 1:1200 конечным разведением FITC-конъюгата антитела козы, специфичного к фрагменту Feγ кролика (Jackson). После статической инкубации при 37°C в течение 1 ч антиген-специфические В-клетки можно идентифицировать благодаря присутствию флуоресцентного гало, окружающего эту В-клетку. Затем эти индивидуальные В-клетки, идентифицированные с использованием микроскопа Olympus, брали микроманипулятором Eppendorf и помещали в пробирку для ПЦР.

Гены варибельной области антитела извлекали из отдельных клеток посредством ПЦР с обратной транскрипцией (RT), используя специфические праймеры для варибельных областей тяжелой и легкой

цепией. Два раунда ПЦР осуществляли на жидкостном роботизированном манипуляторе Aviso Опух со вложенной второй ПЦР, включающей участки рестрикции на 3'- и 5'-концах, которая делает возможным клонирование варибельной области в экспрессирующий вектор млекопитающих для IgG (VH) γ 1 мыши или каппа (VL) мыши.

Конструкции тяжелых и легких цепей совместно трансфицировали в клетки НЕК-293 с использованием Fectin 293 (Invitrogen) и рекомбинантное антитело экспрессировали в 125 мл колбе Эрленмейера в объеме 30 мл после 5-7 суток культуры, супернатанты собирали и антитело очищали с использованием аффинной хроматографии.

Эксперимент 2. Дополнительный скрининг идентифицированных антител.

2.1 Получение PHF.

Белок Тау парных спиральных филаментов (PHF) очищали от образцов головного мозга от доноров с болезнью Альцгеймера или прогрессирующим надъядерным параличом или лобно-височной деменцией в соответствии с протоколом, опубликованным Ksiezak-Reding and Wall (Neurobiology of Aging 15, 11-19, 1994). Фракции 8 (эквивалентна неочищенному PHF-Тау перед центрифугированием в градиенте сахарозы в этом источнике) и 11 (эквивалентна фракции A2, SDS-растворимому PHF, как описано в этом источнике), которые ранее описаны как обогащенные PHF-Тау, извлекали и использовали для анализа ВІАscore и клеточного анализа в эксперименте 3.

2.2 Скрининг ELISA.

Анализ ELISA включал захват растворимого Тау в 384-луночных планшетах Maxisorp (ThermoScientific/Nunc) по 3 мкг/мл в карбонатном покрывающем буфере ($\text{dH}_2\text{O} + 0,16\% \text{Na}_2\text{CO}_3 + 0,3\% \text{NaHCO}_3$). Планшеты блокировали с использованием 1% мас./об. казеина + 1% мас./об. BSA в PBS и затем инкубировали с очищенным антителом 10 мкл/лунка. В планшеты добавляли вторичное HRP-конъюгированное антитело козы против Fc IgG мыши (Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch), после чего следовала визуализация связывания с использованием HRP-субстрата - субстрата ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина, из EMD Millipore; 10 мкл/лунка). Оптическую плотность измеряли на 630 нм с использованием считывателя микропланшетов BioTek Synergy 2.

2.3 Скрининг ВІАscore.

Выбранные моноклональные фрагменты Fab (mFab) получали из химерных антител mIgG1 с использованием набора для расщепления Pierce Ficin (номер по каталогу 44980, Thermo Scientific) в соответствии с протоколом производителя.

Абсорбцию на 280 нм использовали для того, чтобы определять концентрацию стоковых растворов Fab для анализа ВІАscore.

Осуществляли аминную иммобилизацию препарата нерастворимого белка Тау от пациентов с болезнью Альцгеймера (AD-PHF, фракция 11), мономеров изоформы 2 Тау, полученных из НЕК (аминокислоты 1-441), и мономеров изоформы 2, экспрессированной в *E. coli*, на чипе CM5, и измеряли связывание mFab против Тау с использованием прибора ВІАscore T200. Буфер HBS-EP из GE Healthcare использовали для иммобилизации, за исключением AD-PHF, для которых использовали 10 mM уксусную кислоту (pH 3,0). В буфер HBS-EP+ добавляли 300 mM NaCl и 1,25% CM-Dextran (Sigma) и использовали в качестве буфера для анализа. Используя проточную кювету (Fc) 1 в качестве эталона, получали следующие значения RU для Fc2-4: 44 RU с использованием 5 мкг/мл *E. coli* Тау, 56 RU с использованием 5 мкг/м НЕК Тау и 500 RU с использованием разведенного 1:20 раствора материала AD-PHF. Для регенерации использовали два цикла по 60 с в 10 mM глицине (pH 1,7). Скорости потока 10 мкл/мин использовали для иммобилизации и регенерации, а скорость потока 30 мкл/мин использовали для связывания анализируемого вещества. Для AD-PHF применяли множество инъекций вручную для достижения 500 RU, включая кэпирование EDC/NHS и EtoA. Применяли пять стартовых циклов и 12 циклов на образец mFab или буферный контроль, используя инъекции анализируемого вещества 90 мкл в течение 180 с или 300 с для диссоциации. 11 разведений 1:3 раствора 600 нМ плюс буфер использовали для каждого mFab. AB1 анализировали с использованием теста ВІАscore.

Результаты представлены в табл. 1, которая показывает связывание mFab AB1, имеющего VL крысы SEQ ID NO: 7 и VH крысы SEQ ID NO: 8, с мономерной изоформой 2 Тау, экспрессированной в *E. coli*, с мономерной изоформой 2 Тау, полученной из клеток НЕК293 млекопитающего, и с выделенными PHF фибриллами Тау от пациентов с болезнью Альцгеймера (агрегированный Тау). Профиль связывания AB1 и вышеуказанных антител известного уровня техники представлен в табл. 3.

Таблица 1

Ab	Источник Tau	Rmax (RU)	ka (1/мс)	kd (1/с)	KD (M) *
101.4 (изотипически й контроль)	E. coli, изоформа 2	nb	-	-	-
	HEK, изоформа 2	Nb	-	-	-
	AD-PHF	nb	-	-	-
AB1	E. coli, изоформа 2	17	6,9E+04	1,1E-02	1,6E-07
		17	7,3E+04	1,1E-02	1,6E-07
	HEK, изоформа 2	15	7,0E+04	1,1E-02	1,6E-07
		15	6,6E+04	1,1E-02	1,7E-07
	AD-PHF	7	5,2E+04	9,6E-03	1,9E-07
		6	4,4E+04	8,0E-03	1,8E-07

nb=связывание отсутствует

* представлены значения основных связывающих компонентов

Эксперимент 3. Дополнительное определение характеристик идентифицированных антител.

3.1 Клеточный анализ.

Получение неочищенных растворимой и нерастворимой фракций у Tau трансгенных мышей для того, чтобы индуцировать агрегирование Tau.

Для этих экспериментов использовали трансгенных мышей, экспрессирующих Tau человека P301S (Allen et al., 2002 J. Neurosci.22(21):9340-51) и P301L (Lewis et al., 2000 Nat Genet. (4):402-5.; Götz J, et al., 2001 J Biol Chem. 276(1):529-34).

Неочищенные растворимую и нерастворимую фракции получали из головного мозга трансгенные мыши с Tau P301S и P301L посредством дифференциального центрифугирования. В кратком изложении, ткани головного мозга от трансгенных мышей с Tau P301S (спинной мозг и ствол головного мозга) и P301L (средний мозг и ствол головного мозга) гомогенизировали в ледяном TBS (Fisher Scientific) с использованием ручного гомогенизатора Pellet Pestle Motor (Kontes) в 1,5 мл микропробирках для центрифуги на льду. Затем гомогенаты (H) центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин при 4°C для того, чтобы удалять тканевую дебрис. Получаемые супернатанты (S0) центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин при 4°C, чтобы предоставлять супернатанты, соответствующие неочищенной растворимой фракции (S1). Остающиеся пеллеты (P1) ресуспендировали в 1 мл 1% раствора саркозила, приготовленного в TBS, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и затем центрифугировали при 100000 g в течение 1 ч при 4°C. Супернатанты (S2) выбрасывали. Пеллеты (P2) промывали в 5 мл ледяного TBS и затем ресуспендировали в TBS, чтобы предоставлять неочищенную нерастворимую фракцию (P2').

Получение клеток HEK-293-F, экспрессирующих Tau человека с мутацией P301S.

Клетки HEK-293-F (Life Technologies) трансфицировали с использованием вектора pcDNA3.1(+), экспрессирующего изоформу 2 Tau человека с мутацией P301S, используя 293fectin (Life Technologies) по инструкциям производителя. Аликвоты трансфицированных клеток хранили в жидком азоте.

Индукция агрегирования Tau.

На фиг. 3 проиллюстрированы различные стадии анализа агрегирования клеток, используемого для определения характеристик активности терапевтических антител к Tau. В сутки 1 клетки HEK-293-F, экспрессирующие изоформу 2 Tau человека с мутацией P301S (P301S-Tau), размораживали при 37°C и разбавляли с использованием 293 Expression medium (Life Technologies), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку и 1% пенициллин-стрептомицин (FFBS). Клетки считали с использованием автоматического счетчика клеток (Vi-CELL XR, Beckman Coulter) и затем высевали в предварительно покрытые поли-D-лизином 96-луночные планшеты (Greiner Bio-One) при плотности 25000 живых клеток на лунку. Клетки поддерживали при 37°C в 5% CO₂. В те же сутки обработанный звуком нерастворимый Tau человека от пациентов с болезнью Альцгеймера (AD-PHF, фракция 8), или прогрессирующим надъядерным параличом (PSP-PHF, фракция 8), или лобно-височной деменцией (FTD-PHF, фракция 8), или из фракций головного мозга из головного мозга трансгенных мышей с P301S или P301L (используемых качестве затравок для того, чтобы индуцировать агрегирование Tau) инкубировали с антителами против

Тау или без них в среде FFBS при 4°C и легком перемешивании в течение ночи. Фракцию 8 AD-PHF использовали по 80 и 60 нг/мкл для образцов AD и PSP соответственно; растворимую фракцию головного мозга от трансгенных мышей с P301S и P301L использовали по 0,1 мкг/мкл и 1,2 мкг/мкл соответственно. В сутки 2 затравки или смеси затравок/антител наносили на клетки на 24 ч. В сутки 3 среду для культивирования заменяли на свежую среду FFBS, содержащую антитело, и клетки поддерживали в культуре в течение дополнительных 24 ч. В сутки 4 агрегирование Тау измеряли с использованием набора для анализа агрегирования Тау (Cisbio) на основании гомогенного переноса энергии флуоресценции с разрешением по времени (HTRF), по инструкциям производителя. Флуоресценцию измеряли с использованием SpectraMax Paradigm (Molecular Devices). Агрегирование приводили в виде процента агрегирования относительно контроля (-), который соответствует максимальной реакции агрегирования, индуцированной экзогенными фибриллами или фракциями в отсутствие антитела.

Тестировали эффект AB1 и других Тау-связывающих антител известного уровня техники, оказываемый на индуцированное агрегирование Тау. Антитела известного уровня техники представляют собой IPN002 из WO 2014/028777A2, PT3 из WO 2013/096380A2, mAb2.10.3 из WO 2010/142423A2 и HJ8.5 из WO 2014/008404.

Результаты этого анализа сведены в табл. 2 и на фиг. 4.

В табл. 2 сведена активность (IC_{50}) и максимальный эффект (I_{max} при 300 нМ) AB1, имеющего VL крысы SEQ ID NO: 7 и VH крысы SEQ ID NO: 8, Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 17 (L14H17), Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 18 (L14H18), и конкурентных антител против спектра Тау затравок из различных экстрактов головного мозга. При этом на фиг. 4 представлен эффект Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 17 (L14H17), и Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 18 (L14H18), в анализе агрегирования клеток с использованием патологических фибрилл Тау человека от пациентов-людей с AD.

3.2 Гистологический анализ.

Анализировали AB1, имеющее VL крысы SEQ ID NO: 7 и VH крысы SEQ ID NO: 8, и антитела IPN002, PT3 и Mab2.10.3 известного уровня техники и определяли оптимальную концентрацию с использованием криосрезов гиппокампа человека от донора с болезнью Альцгеймера, в которых предварительно показано наличие патологических Тау структур с использованием AT8 иммуноокрашивания (такого как описано в Braak & Braak, 1995, *Neurobiol Aging*; 16(3):271-8). AB1 и все антитела известного уровня техники демонстрировали специфическую и зависящую от концентрации иммунореактивность, кроме 101.4 (отрицательное контрольное антитело). На основании этих данных выбирали одну оптимальную концентрацию антитела, которую использовали для скрининга панели из шести образцов головного мозга человека. Три образца происходили от доноров с болезнью Альцгеймера или от очень пожилых доноров, которые демонстрировали высокие уровни патологии Тау (положительную патологию Тау обнаруживали с использованием иммуноокрашивания AT8), и три от доноров без патологии Тау (отсутствие патологии Тау обнаруживали с использованием иммуноокрашивания AT8).

AB1 и IPN002 демонстрировали специфическое иммуноокрашивание нейрофибриллярных клубков (интранейрональные NFT), цитоплазматическое окрашивание нейрофибриллярных клубков (экстранейрональные NFT), нейритических бляшковидных структур и нейропиллярных нитей в положительных по патологии Тау образцах. Они также демонстрировали иммуноокрашивание в образцах, классифицированных как не имеющих патологии Тау.

Результаты экспериментов 2 и 3 сведены далее в табл. 2 и 3:

Таблица 2

Эксперимент 3.1					
mAB	Т/Г мыши (P301S) IC ₅₀ /I _{max}	Т/Г мыши (P301L) IC ₅₀ /I _{max}	Образцы людей с AD IC ₅₀ /I _{max}	Образцы людей с PSP	Образцы людей с FTD
AB1	IC ₅₀ : 2 нМ I _{max} : 93%	IC ₅₀ : 30 нМ I _{max} : 89%	IC ₅₀ : 4 нМ I _{max} : 98%	Не тестировал и	IC ₅₀ : 3 нМ I _{max} : 97%
L14H17	Не тестировал и	Не тестировал и	IC ₅₀ : 11 нМ I _{max} : 98%	Не тестировал и	Не тестировал и
L14H18	Не тестировал и	Не тестировал и	IC ₅₀ : 12 нМ I _{max} : 98%	IC ₅₀ : 42 нМ I _{max} : 100%	IC ₅₀ : 1 нМ I _{max} : 99%
IPN002	IC ₅₀ : ND I _{max} : 22%	IC ₅₀ : 122 нМ I _{max} : 73%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 19%	IC ₅₀ : 207 нМ I _{max} : 64%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 50%
PT3	IC ₅₀ : 350 нМ I _{max} : 56%	IC ₅₀ : 26 нМ I _{max} : 69%	IC ₅₀ : 32 нМ I _{max} : 69%	IC ₅₀ : 47 нМ I _{max} : 55%	IC ₅₀ : 1 нМ I _{max} : 80%
Mab2.10.3	IC ₅₀ : ND I _{max} : 35%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 29%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 16%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 28% (*)	IC ₅₀ : ND I _{max} : 30%
HJ8.5	IC ₅₀ : ND I _{max} : 43%	Не тестировал и	IC ₅₀ : ND I _{max} : 46%	IC ₅₀ : 73 нМ I _{max} : 79%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 67%

Таблица 3

mAB	Эксперимент 3.2	Эксперимент 2.3	Эксперимент 3.3
AB1	AD ¹ и контр. ²	Моном. ³ и агр. ⁴	+ AD, PSP, контр.
IPN002	AD ¹ и контр. ²	Моном. и агр.	+ AD, PSP, контр.
PT3	AD>контр.	Агр.	Слаб.
Mab2.10.3	AD>контр.	Агр.	Слаб.

¹ означает обнаружение Тау в образцах с подтвержденной патологией Тау

² означает обнаружение Тау в образцах без патологии Тау

³ означает мономерную форму Тау мономерной изоформы 2 Тау, экспрессированной в E. coli, и мономерной изоформы 2 Тау, полученной из клеток млекопитающих HEK293

⁴ означает агрегированную форму Тау выделенных PHF фибрилл Тау от пациентов с болезнью Альцгеймера

ND: не определено

(*) максимальный эффект при 100 нМ 3.3 Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг выполняли с использованием хемилюминесцентного считывания: гомогенаты, полученные от людей с AD, PSP, загружали на 10% полиакриламидные гели (20 мкг белка на дорожку). Белки разделяли посредством SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и осуществляли их перенос на PVDF (поливинилиденфторидную) мембрану. Мембраны блокировали в 4% BSA (бычий сывороточный альбумин (в TBST: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH корректировали с использованием HCl до pH 7,6). Мембраны инкубировали в течение ночи при 4°C с первичным антителом или не иммунным контрольным IgG антителом, промывали в TBST, инкубировали со вторичным антителом (мыши против биотина) в течение 1 ч, промывали в TBST, инкубировали с третичным антителом (против IgG мыши, с пероксидазой) в течение 1 ч, промывали в TBST и проявляли с использованием ECL (усиленная хемилюминесценция) - экспозиция пленок от 2 до 5 мин.

Альтернативно вестерн-блоттинг осуществляли с использованием флуоресцентного считывания: гомогенаты (H), растворимые (S1) и нерастворимые (P2') фракции от трансгенных мышей с Тау или AD-PHF фракцию 8 загружали в гели NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris (Life Technologies), затем разделяли с помощью SDS-PAGE. Разделенные белки электрически переносили на поливинилидендифторидные мембраны с использованием Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad). Мембраны блокировали

блокирующим буфером Odyssey® (LI-COR) и инкубировали в течение ночи при 4°C с различными первичными антителами, разведенными в том же буфере, содержащем 0,1% Tween-20. Вторичные антитела IRDye разводили в блокирующем буфере Odyssey®, содержащем 0,1% Tween-20 и 0,01% SDS (1:5000; LI-COR), инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и визуализировали с использованием системы визуализации Odyssey CLx (LI-COR). Антитела VR4295 (UCB Biopharma S.P.R.L), IPN002, PTR3 и Mab2.10.3 использовали в концентрациях 0,1-1 мкг/мл. Антитела pS202/T205 против Tau (AT8; Thermo Scientific), pThr231 против Tau (AT180; Thermo Scientific) и против полноразмерного Tau (HT7; Thermo Scientific) использовали в разведении 1:200. Для контроля загрузки блоты анализировали на β -актин (1:2000; Sigma). Интенсивности сигналов определяли количественно с использованием Image Studio 3.1 (Li-COR).

AB1, имеющее VL крысы SEQ ID NO: 7 и VH крысы SEQ ID NO: 8, и гуманизированные версии, имеющие легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 17 или легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 18, связываются с патологическим Tau от трансгенных мышей с P301S и P301L и из образцов от людей с AD, PSP и контрольных пациентов. Все три антитела демонстрируют схожий паттерн связывания посредством вестерн-блоттинга и выявляют при AD и PSP типичный паттерн полос между 50 и 75 кДа, соответствующий патологическому Tau при AD и PSP (см. фиг. 5). IPN002 демонстрировало схожее поведение, тогда как антитела PTR3 и Mab2.10.3 связываются с патологическим Tau от трансгенных мышей с P301S и P301L и слабо связывают AD человека, но демонстрируют другой паттерн при вестерн-блоттинге. Антитело 101.4 отрицательного контроля и антитело A33 не дают какого-либо значимого сигнала. Актин использовали в качестве контроля загрузки.

3.4 Определение эпитопа AB1.

Связывание эпитопа антителом AB1, имеющим VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8, определяли с использованием гетероядерного одноквантового корреляционного ядерного магнитного резонанса (HSQC NMR) с использованием фрагмента Fab антитела.

Оценка остова изоформы 4 Tau.

ЯМР образцы обычно составляли 350 мкл в объеме при концентрации белка 270 мкМ для меченой $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ изоформы 4 Tau человека в 5 мм пробирках Shigemi. Буферные условия представляли собой 100 мМ NaCl, 25 мМ фосфата натрия pH 6,4, 10 мкМ AEBFSF, 0,02% NaN_3 . Все эксперименты регистрировали при 20°C на спектрометрах 600 MHz Bruker DRX или 800 MHz Bruker Avance, оснащенных зондами с криогенным охлаждением. Последовательные соединения между ЯМР сигналами остатков остова белка, $\text{H}_\text{N}(\text{i})\text{-N}(\text{i})\text{-N}(\text{i}\pm 1)$, выполняли с использованием 3D эксперимента (H)N(CA)NNH (Weisemann et al., 1993 3D Triple-resonance NMR techniques for the sequential assignment of NH and 15N resonances in 15N- and 13C-labelled proteins. *J. Biomol. ЯМР* 3. doi:10.1007/BF00242479), которые регистрировали при спектральных окнах 1640, 1640 и 7000 Гц и времени регистрации 120 (F1), 120 (F2) и 150 (F3) мс в измерениях ^{15}N , ^{15}N и ^1H соответственно, по 8 сканирований на инкремент и с задержкой релаксации 1,5 с. Использовали неоднородную дискретизацию с плотностью дискретизации 13% (5200 гиперкомплексных точек из 40000), что давало полное время регистрации 3,5 суток. Подтверждали последовательные соединения и идентифицировали типы остатков, используя эксперименты HNCA (Grzesiek and Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *J. Magn. Reson.* 96, 432-440. doi:10.1016/0022-2364(92)90099-S) и HNCACB (Wittekind and Mueller, 1993 HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins. *J. Magn. Reson. Ser. B* 101, 201-205. doi:10.1006/jmrb.1993, 1033). Эксперимент HNCA регистрировали при спектральных окнах 1640, 4830 и 6600 Гц и времени регистрации 24 (F1), 6,6 (F2) и 80 (F3) мс в измерениях ^{15}N , ^{13}C и ^1H соответственно, (8 сканирований на инкремент, задержка релаксации 1,5 с, полное время регистрации 19 ч), тогда как HNCACB регистрировали при спектральных окнах 9800, 1640 и 6600 Гц и времени регистрации 6 (F1), 24 (F2) и 80 (F3) мс в измерениях ^{13}C , ^{15}N и ^1H соответственно, (8 сканирований на инкремент, задержка релаксации 1,5 с, полное время регистрации 1,5 суток). ЯМР спектры обрабатывали с использованием NMRPipe (Delaglio et al., 1995 NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. ЯМР* 6, 277-93) с реконструкцией NUS данных, которую выполняли с использованием способа мягкого итеративного сравнения с порогом Гарварда (Hyberts et al., 2012). Анализ данных осуществляли с использованием Sparky (Goddard and Kneller, D.G. SPARKY 3. In., University of California, San Francisco), что вело к оценке резонансов протонов и азотов амидов для 304 остатков, соответствующих 96% остатков (исключая остатки пролина и N-концевой глицин).

Картирование сайта связывания AB1.

Картирование сайта связывания AB1 осуществляли с использованием образцов меченой $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ изоформы 4 Tau человека в диапазоне концентраций от 80 до 150 мкМ, содержащих 10% молярный избыток соответствующего Fab AB1. Образцы получали в том же буфере, как описано выше для оценки остова Tau. Изменения химических сдвигов ^1H , ^{15}N и ^{13}C определяли по спектрам HNCO (Grzesiek and Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *J. Magn. Reson.* 96, 432-440. doi:10.1016/0022-2364(92)90099-S), зарегистрированным на образцах комплексов Tau/Fab, а также

образце свободного Тау (как описано выше). Эксперименты HNCO регистрировали при спектральных окнах 2190, 2210 и 8800 Гц и времени регистрации 25 (F1), 29 (F2) и 80 (F3) мс в измерениях ^{15}N , ^{13}C и ^1H соответственно (8 сканирований на инкремент, задержка релаксации 1,8 с), где применяли NUS, используя плотности дискретизации 25-35%, что снижало полное время регистрации с 60 до 15-21 ч. Изменения химических сдвигов анализировали с использованием подхода минимального сдвига (Williamson et al., 1997 Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation. *Biochemistry* 36, 13882-9. doi:10.1021/bi9712091), по существу, как описано ранее (Veverka et al., 2008 Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. *Oncogene* 27, 585-95. doi:10.1038/sj.one.1210693), за исключением модификации в уравнении, используемом для того, чтобы вычислять комбинированное изменение химического сдвига ($\Delta\delta$), чтобы включать химический сдвиг карбонила, что давало следующее уравнение:

$$\Delta\delta = \frac{\sqrt{(\Delta\delta\text{HN})^2 + (\Delta\delta\text{N}\alpha\text{N})^2 + (\Delta\delta\text{C}\alpha\text{C})^2}}{3}$$

где $\Delta\delta\text{HN}$, $\Delta\delta\text{N}$ и $\Delta\delta\text{C}$ представляют собой разности в химических сдвигах ^1H , ^{15}N и ^{13}C соответственно. αN и αC соответствуют коэффициентам масштабирования, равным 0,2 и 0,35 соответственно, которые используют для того, чтобы учитывать различия в диапазонах химических сдвигов для химических сдвигов амидного протона, азота и карбонила.

Для того чтобы идентифицировать сайты связывания Fab (эпитопы) на Тау, использовали гистограмму комбинированного минимального сдвига в зависимости от последовательности белка, чтобы обнаруживать области Тау, содержащие значительно искаженные сигналы. Если величина изменения комбинированного химического сдвига для индивидуальных аминокислот превышала пороговое значение среднего изменения комбинированного химического сдвига для всех аминокислот плюс одно стандартное отклонение от этого среднего, эти остатки отбирали для дальнейшей оценки в качестве возможных контактирующих остатков в сайте связывания Fab.

Значительно искаженные остатки идентифицировали как те, минимальный сдвиг которых был по меньшей мере больше, чем среднее плюс одно стандартное отклонение всех вычисленных сдвигов. Четыре различных порога применяли для того, чтобы идентифицировать остатки, связываемые Fab. Остатки, которые входят в сайт связывания, оценивали с увеличением степени строгости как: те, минимальный сдвиг которых превышает среднее плюс одно стандартное отклонение для всех вычисленных сдвигов ($>0,009817$); те, минимальный сдвиг которых превышает среднее плюс два стандартных отклонения для всех вычисленных сдвигов ($>0,016913$); те, минимальный сдвиг которых превышает среднее плюс три стандартных отклонения для всех вычисленных сдвигов ($>0,024009$); те, минимальный сдвиг которых превышает среднее плюс четыре стандартных отклонения для всех вычисленных сдвигов ($>0,031105$). В этом анализе остатки пролина нельзя идентифицировать, поскольку они не содержат амидный протон.

Следовательно, эпитоп для Fab AB1 идентифицировали с возрастающей степенью строгости как среднее плюс одно стандартное отклонение для всех вычисленных сдвигов: A246, A239, S241, T245, S238, S235, K240, Q244, S237, V248, L243, M250, R242; среднее плюс два стандартных отклонения всех вычисленных сдвигов: A246, A239, S241, T245, S238, S235, K240, Q244, S237; среднее плюс три стандартных отклонения всех вычисленных сдвигов: A246, A239, S241, T245, S238, S235, K240, Q244; среднее плюс четыре стандартных отклонения всех вычисленных сдвигов: A246, A239, S241, T245, S238.

Используя нумерацию аминокислот, используемую в эталонной последовательности NCBI NP_005901.2 (SEQ ID NO: 35), обнаружено, что AB1 связывается, по меньшей мере, со следующими остатками (среднее+3 SD): A246, A239, S241, T245, S238, S235, K240, Q244. Антитело может связывать все из следующих остатков (среднее+1 SD): A246, A239, S241, T245, S238, S235, K240, Q244, S237, V248, L243, M250, R242.

Эксперимент 4. Гуманизация идентифицированных антител.

Антитело AB1, имеющее VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8, гуманизировали посредством пересадки CDR из V-областей антитела крысы в каркасы V-областей антитела человека эмбрионального типа.

Для того чтобы восстанавливать активность антитела, в гуманизированной последовательности также сохраняли определенное число каркасных остатков из V-областей крысы или кролика. Эти остатки отбирали с использованием протокола, описанного Adair et al. (1991) (Humanized antibodies. WO 91/09967). Выравнивания последовательностей V-областей антитела (донорного) крысы с последовательностями V-областей зародышевой линии (акцепторными) человека представлены на фиг. 1 и 2, вместе со сконструированными гуманизированными последовательностями. CDR, которые пересаживали из донорной последовательности в акцепторную, определены у Kabat (Kabat et al., 1987), за исключением CDR-H1, где используют комбинированное определение Chothia/Kabat (см. Adair et al., 1991 Humanized antibodies. WO 91/09967).

V-область человека IGRV2-29 плюс J-область JR2 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) (SEQ ID NO: 31) выбирали в качестве акцептора для CDR легких цепей антитела AB1. Каркасные остатки легких цепей в

графте gVL3_ABI (SEQ ID NO: 14) из гена зародышевой линии человека.

V-область человека IGHV4-59 плюс J-область JH3 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) (SEQ ID NO: 32) выбирали в качестве акцептора для CDR тяжелых цепей антитела AB1. Все каркасные остатки тяжелых цепей в графтах gVH17_ABI (SEQ ID NO: 17) и gVH18_ABI (SEQ ID NO: 18) из гена зародышевой линии человека, за исключением остатка 48 (нумерация Kabat), где сохраняли донорный остаток метионина (M48). Сохранение остатка M48 делало возможной полную активность гуманизированного антитела. Остаток глутамина в положении 1 каркаса человека заменяли на глутаминовую кислоту (E1), чтобы сделать возможной экспрессию и очистку гомогенного продукта: часто сообщается о превращении в глутамина в пироглутамат на N-конце антител и фрагментов антител. В CDRH2 в SEQ ID NO: 37 и 38 вносили мутации в графтах gVH17_ABI и gVH18_ABI соответственно, чтобы модифицировать потенциальный участок дезамидирования.

Гены, кодирующие множество вариантов последовательностей V-областей тяжелых и легких цепей антитела, разрабатывали и конструировали посредством автоматизированного синтеза с помощью DNA2.0 Inc. Дополнительные варианты V-областей тяжелых и легких цепей создавали посредством модификации генов VH и VK с помощью направляемого олигонуклеотидами мутагенеза, включая в некоторых случаях мутации в CDR для того, чтобы модифицировать потенциальные участки дезамидирования. Для временной экспрессии в клетках млекопитающих гены гуманизированных V-областей легких цепей клонировали в экспрессирующий вектор UCB pMhCK для легких цепей человека, который содержит ДНК, кодирующую константную область каппа цепи человека (аллотип Km3). Гены гуманизированных V-областей тяжелых цепей клонировали в экспрессирующий вектор UCB pMhγ4P FL для тяжелых цепей γ-4 человека, который содержит ДНК, кодирующую константную область тяжелой цепи γ-4 человека с мутацией S241P, стабилизирующей шарнир (Angal et al., *Mol Immunol.* 1993, 30(1):105-8). Альтернативно гены гуманизированных VH клонировали в экспрессирующий вектор UCB pMhγ1FL для тяжелых цепей γ-1 человека, который содержит ДНК, кодирующую константную область тяжелой цепи γ-1 человека (аллотип G1m17.1). Для того чтобы оценивать кинетику одновалентного связывания гуманизированных антител, гены гуманизированных VH также клонировали в экспрессирующий вектор UCB pMhFabI_OHIS для Fab-HIS человека, который содержит ДНК, кодирующую γ-1 СН1-шарнирный домен человека с С-концевой меткой из 10 остатков гистидина: гистидиновая метка облегчает очистку экспрессированных Fab посредством аффинной хроматографии. Совместной трансфекции векторов получаемых тяжелых и легких цепей в суспензию клеток HEK293 достигали с использованием 293fectin (12347-019 Invitrogen), и получают экспрессию гуманизированных рекомбинантных антител в формате IgG4P, IgG1 или Fab-HIS человека.

Варианты цепей гуманизированных антител и их сочетания экспрессировали и оценивали по их активности относительно исходного антитела, их биофизических свойств и пригодности к последующей обработке.

Для стабильной экспрессии гуманизированных рекомбинантных антител в клетках млекопитающих ген V-области гуманизированной легкой цепи соединяли с последовательностью ДНК, кодирующей константную область Сκ человека (аллотип Km3), чтобы создавать непрерывный ген легкой цепи. Гены гуманизированных тяжелых цепей соединяли с ДНК, кодирующей константную область тяжелой цепи γ-4P человека или константную область тяжелой цепи γ-1 человека (аллотип G1m17.1), чтобы создавать непрерывные гены тяжелых цепей. Гены тяжелых и легких цепей клонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих.

Эксперимент 5. Измерение тепловой стабильности.

Температуру плавления (T_m) или температуру в средней точке нарушения укладки определяли с использованием анализа ThermoFluor. В этом способе, флуоресцентный краситель SYPRO orange использовали для того, чтобы осуществлять мониторинг процесса нарушения укладки белка посредством связывания с гидрофобными областями, которые становятся обнаженными по мере увеличения температуры.

Реакционная смесь содержала 5 мкл красителя 30× SYPRO® Orange (Invitrogen), разведенного в PBS из 5000× стокового раствора, и 45 мкл образца с концентрацией 0,12 мг/мл (в PBS pH 7,4). 10 мкл смеси дозировали в четырех повторениях в 384-луночный оптический планшет для ПЦР и запускали на 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Нагревательное устройство ПЦР системы устанавливали на 20-99°C при скорости роста 1,1°C/мин. Устройство с зарядовой связью осуществляло мониторинг изменений флуоресценции в лунках. Увеличение интенсивности наносили на график, и точку перегиба кривой(ых) использовали для того, чтобы вычислять T_m , как описано ниже.

Анализ антител, содержащих легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую вариабельную цепь SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13 для изотипов IgG1 (легкая цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелая цепь SEQ ID NO: 54 (L14/H54) или легкая цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелая цепь SEQ ID NO: 55 (L14/H55)) и IgG4 (легкая цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелая цепь SEQ ID NO: 17 (L14/H17) или легкая цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелая цепь SEQ ID NO: 18 (L14/H18)), представлен далее на фиг. 6 и в табл. 3. Нарушение укладки двух доменов наблюдали для обоих изотипов. Первые можно связать с T_m домена СН2; обнаружено, что для изотипа IgG1 она выше (более стабильны), чем для формата IgG4, что соответствует литературе (Garber E, Dema-

rest SJ. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Apr 13;355(3):751-7). Нарушение укладки второго домена можно связать с усредненной Tm нарушения укладки домена Fab и домена CH3.

Антитело	Fab/CH3 (среднее)	Fab/CH3 (SD)	CH2 (среднее)	CH2 (SD)
L14/H17	80, 9°C	0, 3°C	64, 5°C	0, 3°C
L14/H18	81, 4°C	0, 7°C	64, 5°C	0, 5°C
L14/H54	82, 8°C	0, 2°C	68, 8°C	0, 2°C
L14/H55	83°C	0, 1°C	68, 8°C	0, 2°C

Эксперимент 6. Рентгеновская кристаллография.

Взаимодействие между Тау-связывающим антителом, имеющим легкую цепь SEQ ID NO: 14 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 18 (L14H18), и пептидом, состоящим из остатков с 234 до 250 из Тау, как определено в SEQ ID NO: 35 (пептид, N-ацетил-KSPSSAKSRLQTAPVPM-амид, который определен в SEQ ID NO:), изучали с помощью рентгеновской кристаллографии.

Кристаллизация, определение структуры и уточнение кристаллической структуры пептида Тау в комплексе с Fab L14H18.

Кристаллизация.

Комплекс Fab L14H18/пептид Тау 234-250, кристаллизованный из сидячей капли через паровую фазу против резервуара, содержащего 30% мас./об. полиэтиленгликоля 4000, 0,1М HEPES, pH 7,5, 0,2 М дегидрата хлорида кальция в течение 1-2 недель в MRC планшетах.

Капли содержали 400 нл белка Fab L14H18 с концентрацией 11 мг/мл с 2 молярным избытком пептида Тау 234-250 и 400 нл раствора резервуара.

Кристаллы относятся к пространственной группе P 31 2 1, с двумя копиями Fab L14H18/пептида Тау 234-250 в асимметричной ячейке.

Получение рентгеновской дифракции.

Авторы изобретения собирали данные рентгеновской дифракции с помощью монокристалла Fab L14H18/пептида Тау 234-250. Кристалл подвешивали в лито-петле и быстро замораживали под жидким азотом, после быстрого прожожения через раствор криозащитного средства, содержащий 30% полиэтиленгликоль 4000, 0,2 М хлорид кальция, 0,1 М буфер HEPES pH 7,5 и 10% этиленгликоль. Данные дифракции собирали на Pilatis 6M с использованием станции синхротронного излучения 104-1 в синхротроне Diamond, Didcot, Oxfordshire, UK. Длина волны монохроматического рентгеновского пучка составляла 0,92819 ангстрема. Обратное пространство дискретизировали с шагом осцилляции 0,2° вокруг оси гониостата ϕ . XIA файл обработанных данных, предоставленный синхротронной установкой, использовали для определения структуры.

Определение структуры.

Положение Fab определяли с помощью программы молекулярных замен Phaser (Read, RJ, Acta Cryst. D57, 1373-1382 (2001)), используя Fab с кодом PDB 4NIX. Коэффициент Мэтьюса показывал вероятную молекулярную массу 100 кДа в элементарной ячейке, решение нашло 2 копии Fab в асимметричной ячейке.

Построение и уточнение модели.

Используя карты электронной плотности 2Fo-Fc и Fo-Fc, остатки в молекуле Fab заменяли в соответствии с последовательностью Fab L14H18 в положениях, на которые указывали карты электронной плотности.

Fab цепи C и D во второй копии Fab имели более четкую плотность, чем первая копия (цепи H и L).

Избыточная электронная плотность видна смежно с CDR одной копии Fab (цепи C и D). Это обнаруживало пептидную цепь со спиральной структурой, в которую может быть встроена часть последовательности пептида 234-250. Пептид выравнивали с использованием четкой плотности для остатков аргинина и лизина, затем проводили построение в соответствии с известной последовательностью. Дополнительные раунды построения и уточнения модели улучшали плотность для пептидной области и показывали некоторую плотность для пептида, связанного с другой копией Fab (цепи H и L).

Для построения модели использовали компьютерную программу Coot (Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowton K. Acta Crystallography D Biol Crystallography, 2010 Apr; 66 (Pt 4): 486-501). Уточнение осуществляли с использованием программы REFMAC (Murshudov G.N., Skubak P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2011 Apr; 67 (Pt 4): 355-67).

Модель комплекса Fab L14H18/пептида Тау 234-250 состоит из остатков 234-244 пептида Тау, как определено в SEQ ID NO: 35, остатков 2-219 тяжелой цепи и 1-219 легкой цепи.

R-фактор модели составляет 0,234 и свободный R-фактор составляет 0,291 для 36483 отражений. Среднее квадратичное отклонение от стандартной геометрии составляет 0,0145 для длин связей и 1,93°

для углов связей.

Эпитоп.

Взаимодействие между антителом L14H18 и пептидом Тау, N-ацетил-KSPSSAKSRLQTAPVPM-амидом (на основании последовательности изоформы 2 Тау человека от 234 до 250), изучали посредством рентгеновской кристаллографии с использованием комплекса, полученного из Fab фрагмента L14H18, который инкубировали с пептидом. Получаемая структура выявляла основные участки контакта между Fab L14H18 и пептидом Тау, которые идентифицировали как кластеризованные преимущественно в петлях CDR антитела и остатках пептида SPSSAKSRLQ, соответствующих остаткам 235-244 белка Тау. В соответствии с нумерацией последовательности, как показано в SEQ ID NO: 35, остатки, которые взаимодействуют наиболее тесно с областью CDR в Fab L14H18 в пределах 5,0 ангстрема, представляют собой S235, P236, S237, S238, A239, K240, R242, L243, Q244 и T245.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, которое содержит варибельную область легкой цепи, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO:1, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO:2 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO:3; и варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO:4, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO:5 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO:6.

2. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, которое содержит варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:9 или последовательности, которые на 80% идентичны ей, и варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:11, 12, 13 или последовательности, которые на 80% идентичны им.

3. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по п.1 или 2, где варибельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:10.

4. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-3, которое содержит варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:9, и/или варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:10.

5. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-4, которое содержит легкую цепь, содержащую SEQ ID NO:14 или последовательности, которые на 80% идентичны ей, и/или тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO:17 или 18.

6. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-5, которое представляет собой моноклональное гуманизованное антитело или его связывающий фрагмент.

7. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, полученное против эпитопа в пределах аминокислот 235-250 последовательности SEQ ID NO:35.

8. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-7, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки S238, A239, S241, T245, A246 последовательности SEQ ID NO:35.

9. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-8, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки S238, A239, S241, T245, A246 и один или несколько остатков, выбранных из S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248 и M250, последовательности SEQ ID NO:35.

10. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-9, которое связывается как с растворимым Тау-белком человека, так и со спаренными спиральными филаментами (PHF) Тау-белка человека.

11. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или 8-10.

12. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая или тяжелую цепь Тау-связывающего антитела, или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или 8-10.

13. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновые последовательности по п.11 и 12.

14. Клетка-хозяин для получения антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или 8-10, содержащая одну или несколько векторов экспрессии по п.13.

15. Способ получения Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или 8-10, включающий, по меньшей мере, стадии:

c) культивирование клетки-хозяина по п.13;

d) выделение указанного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента.

16. Применение выделенного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-10 в качестве активного средства для лечения нейродегенеративного заболевания.

17. Применение выделенного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-10 для лечения таупатии.

18. Применение по п.17, где указанная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера или прогрессирующий надъядерный паралич.

19. Применение выделенного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-10 в качестве средства диагностики нейродегенеративного заболевания.

20. Применение выделенного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-10 для диагностики таупатии.

21. Применение по п.20, где указанная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера или прогрессирующий надъядерный паралич.

VL_AB1

DIVMTQTPVLSVTLGDQASISCRSSQSLEYSSDGYTYLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS
NRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHNPYTFGAGTKLEIK

IGKV2_29

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVS
SRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLPYTFGQGTKLEIK

gVL3_AB1

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLEYSSDGYTYLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQATHNPYTFGQGTKLEIK

Фиг. 1

VH_AB1

EVKLEESGPGLMQPSETLSLTCTVSGFSLTSNDIWVRQPLGKGLVWMTIWTDGSTNYN
SAVQSRLSISRDTSKSQFFLKMNSLQPEDTGTYYCARHRLYYGAFDYWGQGMVTVSS

IGHV4-59

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYN
PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR-----DAFDVWGQGMVTVSS

|

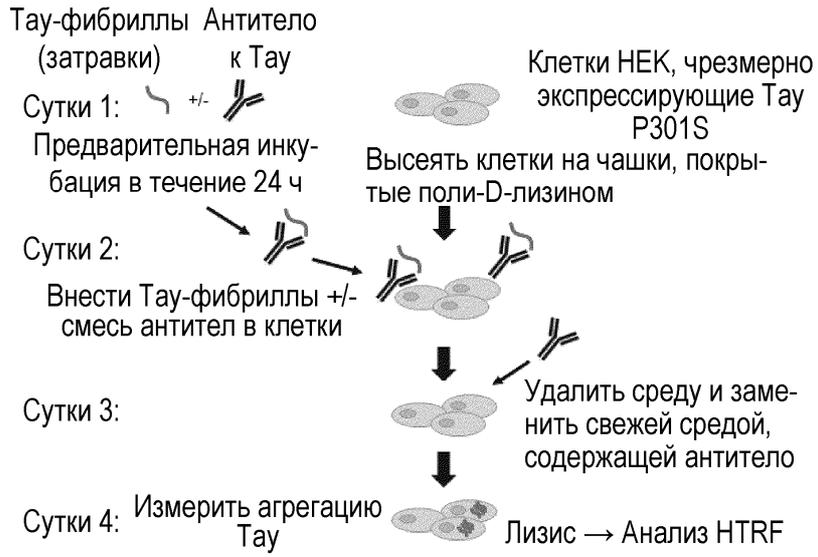
gVH17_AB1

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSNDIWIRQPPGKGLEWMTIWTDGSTNYN
AAVQSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHRLYYGAFDYWGQGMVTVSS

gVH18_AB1

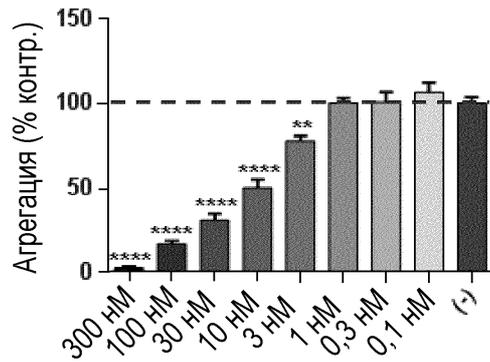
EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSNDIWIRQPPGKGLEWMTIWTDGSTNYN
TAVQSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHRLYYGAFDYWGQGMVTVSS

Фиг. 2

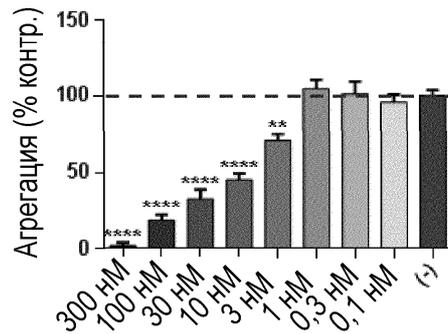


Фиг. 3

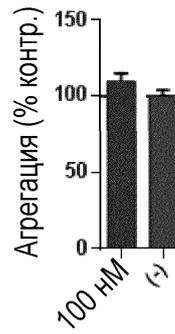
А



В

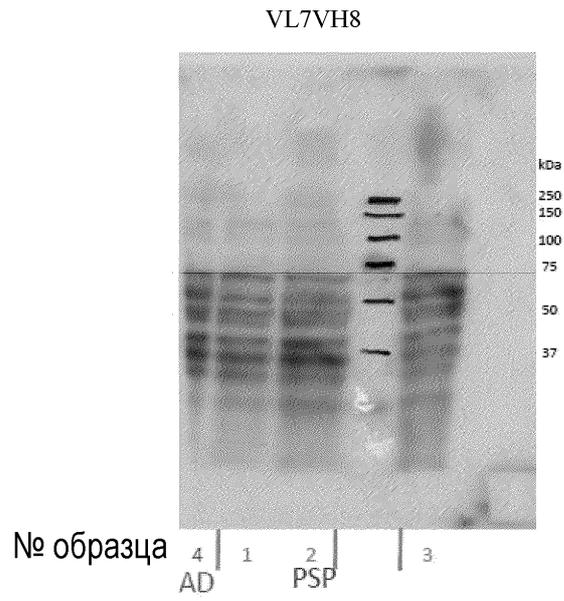


С

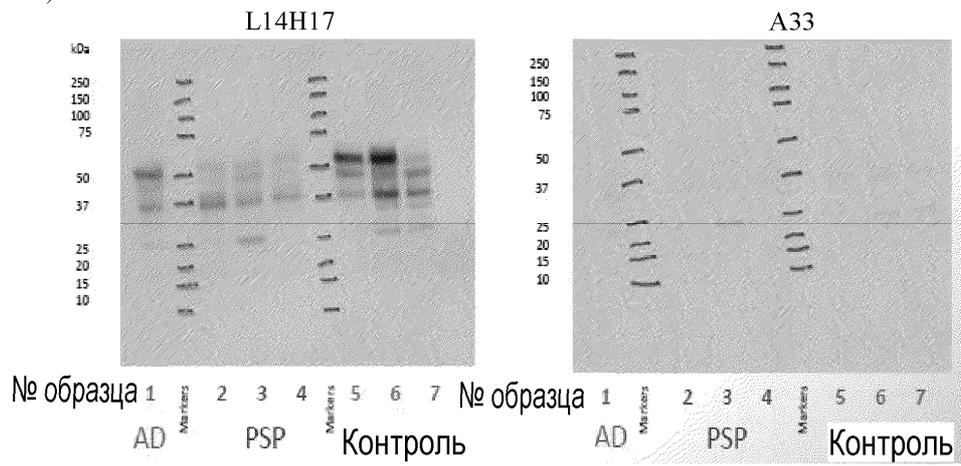


Фиг. 4

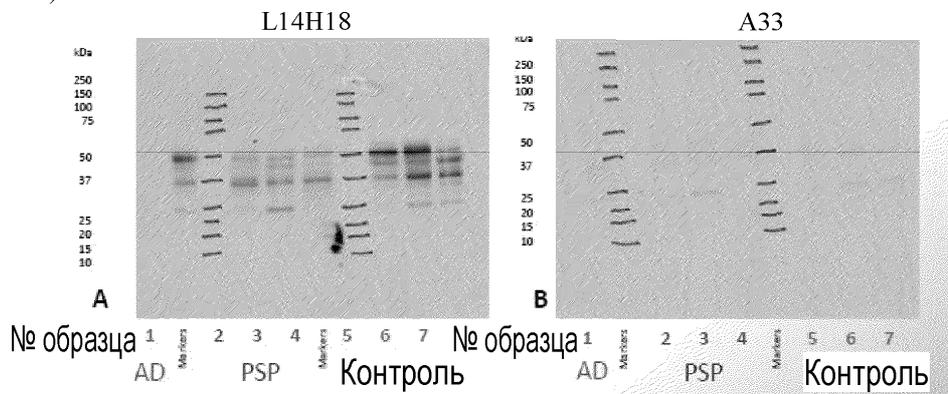
A)



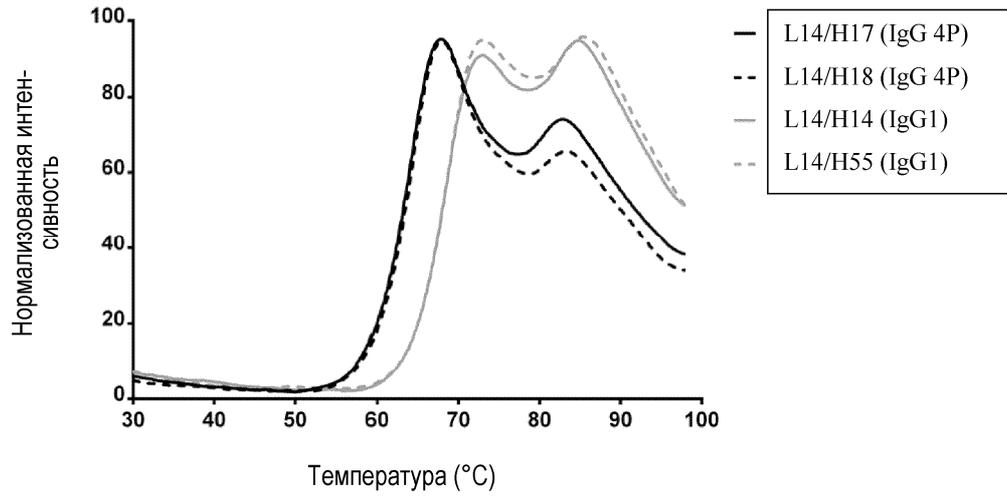
B)



C)



Фиг. 5



Фиг. 6

Конструкция ДНК, кодирующей изоформу 2 Тау человека для экспрессии в *E. coli* (SEQ ID NO: 39)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTT
GCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGGATTTAGTGCTTTACGGCA
CCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT
TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTGTCCAAACTGGAACAACACTC
AACCCATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTCCGGCTATTTGGTTAAAAAA
TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATATAACGTTTACAATTTACGGTGGCA
CTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
CTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACA
TTTCCGTGTGCGCCCTATTCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCCACCCAGAAACGC
TGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAAC
AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT
GCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATT
CTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
GAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAATTACTTCTGACAACGATCGG
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACA
ACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGAT
GGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATA
AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
GATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
ATTTAAACTTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAA
ATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
AGATCCTTTTTTTCGCGCTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTT
GTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAAGAGCGCAGATACCA
AATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATA
CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGG
ACTCAAGACGATGTTACCCGATAAGGCCAGCCCTCGGCTCAACCGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACAGTACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT
TCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGCGCACGAGGG
AGCTTCCAGGGGGAAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTTGACTTGAGCGT
CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACCGGCCTTTTTTACG
GTTCTTGGCCTTTTGTGCGCTTTTGTCTCACATGTTCTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATCTGTGGATA
ACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCCGAAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACA
CCGCATATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCG
CTATCGTACGTGACTGGGTGATGGTGCGCCCGACACCCGCCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACG
GGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGA
GGTTTTACCGTCTACCCGAAACGCGGAGGCAGCTGCGGTAAGCTCATCAGCGTGGTGTGAGG
GATTCACAGATGTCTGCCTGTTTATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTG
GCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAG
GGGATTTCTGTTTATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACT
GATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGCGGGA
CCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCTGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTA
GCCAGCAGCATCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGA
CTTTACGAAACACGGAACCGAAGACCATTGATGTTGTTGCTCAGGTGCGAGACGTTTTTGCAGCAGCA
GTCGCTTACGTTCTGCTCGGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTA
GCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGCATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCATGCCGGCGATAATGGCC
TGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTCAAGATTC

GAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAATGACCC
 AGAGCGTGCCTGACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCCTGCGACGATA
 GTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTCGAGATCC
 CGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAA
 ACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTGCCTATTGGGCGC
 CAGGGTGGTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCTGGCCCTGAG
 AGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGGCCAGCAGCGGAAAATCCTGTTGATGGTGGTTAAC
 GCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGATCGTATCCACTACCGAGATGTCGCGACCAACGCG
 CAGCCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTGGCCAGGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAG
 TGGGAACGATGCCCTCATTAGCATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCT
 TCCCCTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGAGACG
 CGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCGCTAACAGCGGATTTGCTGGTGACCAATGCGACAGATGCT
 CCACGCCAGTCCGCTACCGTCTTTCATGGGAGAAAATAACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACA
 TCAAGAAAATAACCGGAACATTAAGTGCAGGCGACTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGG
 ATAGTTAATGATCAGCCACTGACCGGTTGCGCGAGAAGATTGTGACCGCGCTTTACAGGCTTCGA
 CGCCGCTTCTGTTTACCATCGACACCACCGCTGGCACCAGTTGATCGCGCGAGATTTAATCGCC
 CGGCAATTTGCGACGGCGGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTT
 GCCCGCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTT
 CCCGCTTTTTCGAGAAAACGTTGGCTGGCTGGTTTACCACGCGGAAACGGTCTGATAAGAGACCCG
 GCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTACATTCACCACCTGAATGACTCTCTTCCGG
 CGCTATCATGCCATACCGGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCC
 TTATGGTACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGACCGCCGCGCAAG
 GAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGC
 CGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCCGATCTTCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAG
 GCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCGGTGATGCCGGCCACGATCGCTCCGGCGTAGAGGATCGAGAT
 CGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATGTGAGCGGATAACAATCCCCTC
 TAGAAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT**ATGGGCTCAAGCCACCACCACCACC**
ACAGCAGCGCGGAGAACTTGTACTTTCAAGGATCCGCAGAACCGTCAAGAATTTGAGGTTATGGAA
GATCACCGGGCAGTACGGTTTGGGTGATCGTAAAGACCAGGGCGGCTATACCATGCATCAAGATCA
AGAGGGCGACACCGATGCTGGCTTGAAGAGTGCCTGTCAGACTCCGACCGAGGATGGCAGCGAAG
AGCCGGGCGAGACTAGCGATGCGAAGTGCACCCGACCGCGAGGACGTTACCGCACCGTGGTC
GACGAGGGTCTCCGGGTAACAGCGCGCTGCACAGCCGCACACGGAGATTCCGGAAAGCACCCGC
AGAAGAGGGGGTATCGGCGACACTCCGTCCTGGAAGATGAGGCAGCCGGTTCATGTCACGCAGGCGC
GTATGGTGAGCAAGAGCAAGATGGTACGGGTAGCGACGACAAGAAGCGAAGGGCGGAGATGGCAAG
ACCAAAATTCGCGACCGCGGTGGTGGCGCACCGCCAGGCCAGAAAGGTCAGGCGAATGCCACGCGCAT
CCCGGCAAAAGACGCCACCGGCTCCGAAAACCCCGCTTCCAGCGGTGAACCGCCGAAATCCGGTGACC
GCAGCGGTTATAGCTCTCCGGGTAGCCCGGTACCCAGGCAGCGTAGCCGCACCCGAGCCTGCCG
ACCCACCGACCCGAGCCGAAGAAAGTGGCGGTGGTTCTGACCGCCAAAAGCCCGAGCTCTGC
CAAGAGCCGTCTGCAAAACCGCTCCTGTGCCGATGCCGGACCTGAAGAAGCTTAAAGTCTAAAATCGGTA
GCACCGAAAATCTGAAGCACAACCTGGTGGCGGTAAGGTTCAAATCATCAACAAAAGCTGGACTTG
AGCAATGTACAAAGCAAGTGTGGTAGCAAGGACAATATCAAACACGTCCTCCGGGTGGTGGTTCCGTTCA
GATTGTGTACAAACCGGTGGACCTGAGCAAGGTTACCAGCAAATGCGGTTCCCTGGGTAACATCCATC
ATAAACCGGGTGGCGGCAAGTTGAGGTCAGAGCGGAAACTGGACTTCAAAGACCGGTTCCAGTCC
AAAATCGGTTCTCTGGACAACATTACGCACGTGCTGGTGGTGGCAACAAGAGATTGAAACCCATAA
ACTGACGTTTCTGAAAATGCGAAGGCGAAAACCGACCGGCGCAGAGATTGTCTACAAAAGCCCGG
TGGTGAGCGGTGATACCAGCCCGCTCACCTGTCCAACGTCAGCAGCACGGGCAGCATTGATATGGTG
GATAGCCCGAGTTGGCTACGCTGGCCGATGAGGTTAGCGCGAGCCTGGCGAAGCAGGGTCTGTGACT
 CGAGCACACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTG
 CTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
 CTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

Фиг. 7

A) Экспрессированная последовательность рЕТ 6His-TEV-hTau iso2 (1-441), содержащая участок 6His tag-TEV (SEQ ID NO: 40)

MGSSHHHHHSSGENLYFQGSAPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGL
 KESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTTEIPEGTTAEEA
 GIGDTPSLEDEAAGHVTVQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANAT
 RIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTP
 PKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKSIGSTENLKHQFGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD
 NIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIIGSLD
 NITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSVDTSRHLNSVSTGSDMVD
 SPQLATLADEVASLAKQGL

B) Конечная последовательность, экспрессированная с рЕТ 6His-TEV-hTau iso2 (1-441), после TEV расщепления (SEQ ID NO: 41)

GSAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPGSE
 TSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTVQ
 ARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEP
 PKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMP
 DLKKNVSKSIGSTENLKHQFGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
 DSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT
 FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSVDTSRHLNSVSTGSDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL

Фиг. 8

Конструкций ДНК, кодирующей изоформу 3 человека Тау для экспрессии в *E. coli* (pET 6His TEV-hTau iso 3 (1-383)) (SEQ ID NO: 42)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
 CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTT
 GCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGGATTTAGTGCTTTACGGCA
 CCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGCTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT
 TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACAACACTC
 AACCCATCTCGGTCTATTCTTTTGAATTTATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCATTTGGTTAAAAAA
 TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGGAATTTAACAAAAATTTAACGTTTACAATTTTCAGGTGGCA
 CTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
 CTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACAA
 TTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTGTCTCACCCAGAAACGC
 TGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAATGGATTCGCAAC
 AGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCT
 GCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATT
 CTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAAG
 GAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
 AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCACAAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGTCTGGTGGG
 AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACA
 ACGTTGCGCAAACTATTAACGGCAACTACTTACTTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGAT
 GGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATA
 AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTGCGGTATCATTGACGACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
 CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
 GATAGTGCCCTCACTGATTAAGCATTTGGTACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
 ATTTAAAACCTTCAATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGGATAATCTCATGACCAA
 ATCCCTTAAACGTGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTACAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
 AGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACCCGCTACCGAGCGGTGGTTT
 GTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCA
 AATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGATGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATA
 CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGG
 ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
 AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT
 TCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGAGGGTCCGAAACAGGAGCGCAGCAGGG
 AGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTTACTGACTTGAGCGT
 CGATTTTTGTGCTGCTGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTTTTACG
 GTTCTGCGCTTTTTGCTGGCCTTTTGTCCATGTTCTTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATA
 ACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTGCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
 GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACA
 CCGCATATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCG
 CTATCGCTACGTGACTGGGTGATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACCGCCCTGACG
 GGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGA
 GGTTTTACCGCTCATCACGAAACGCGCGAGGCGAGCTGCGGTAAGCTCATCAGCGTGGTCTGTAAGC
 GATTCACAGATGTCTGCTGTTTATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTG
 GCTTCTGATAAAGCGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCTCCGTGTAAG
 GGGGATTTCTGTTTATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACT
 GATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGCGGGGA
 CCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATAACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTA
 GCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTTCCAGA
 CTTTACGAAACACGGAACCCGAAGACCATTATGTTGTTGCTCAGGTGCGAGACGTTTTGACGAGCA
 GTCGCTTACGTTTCGCTGCGGTATCGGTGATTCATTTCTGCTAACCAAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTA
 GCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCATGCCGGGATAATGGCC
 TGCTTCTGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTC
 GAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATGCTGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAATGACCC
 AGAGCGCTGCCGACCTGCTCTACGAGTTGCATGATAAAGAACAGTCATAAGTGCAGCGCAGGATA

GTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCC
 CGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTGGGAA
 ACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGCTATTGGGCGC
 CAGGGTGGTTTTTCTTTCCACAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCTGGCCCTGAG
 AGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTCCCGCAGCAGCGAAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAAC
 GCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTTCGTATCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCG
 CAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAG
 TGGGAACGATGCCCTCATTCAGCATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCCGCT
 TCCCCTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCGAGCG
 CGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTGCTGGTGACCCAATGGCACCAGATGCT
 CCACGCCAGTCCGCTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACA
 TCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGG
 ATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATGTGCACCGCCGCTTACAGGCTTCGA
 CGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCGCTGGCACCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCC
 GCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTT
 GCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTT
 CCCGCGTTTTTCGAGAAAACGTTGGCTGGCTGGTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCG
 GCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTACATTCACCACCCTGAATGACTCTCTTCCGG
 GCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCC
 TTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAG
 GAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCGCCGACGGGCTGCCACATACCCACGC
 CGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCGATCTTCCCATCGGTGATGTCCGCGATATAG
 GCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGTTGATGCCGCGCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGAT
 CGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTTGAGCGGATACAATTCCTCTC
 TAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGCTCAAGCCACCACCACCACC
ACAGCAGCGGCGAGAACTTGTACTTTCAAGGATCCGCAGAACCCAGTCAAGAATTTGAGGTTATGGAA
GATCACCGGGCACTTACGGTTTTGGGTGATCGTAAAGACCAGGGCGGTATACCATGCATCAAGATCA
AGAGGGCGACACCGATGCTGGCTTGAAAGCAGAAGAGGGCGGTATCGGCGACACTCCGTCCTGGAAG
ATGAGGCAGCCGGTATGTCACGCAGGCGCGTATGGTGAGCAAGAGCAAGATGGTACGGGTAGCGAC
GACAAGAAGGGCAAGGGCGCAGATGGCAAGACAAAAATTCGACCGCCGTTGGTGGCGCACCGCCAGG
CCAGAAGGTCAGGCGAATGCCACGCGCATCCCGGCAAAGACGCCACCGGCTCCGAAAAACCCGCTT
CCAGCGGTGAAACCGCGAAATCCGGTACCGCAGCGGTTATAGCTCTCCGGGTAGCCGGTCCCA
GGCAGCCGTAGCCGACCCCGAGCCTGCCGACCCACCGACCCGCGAGCCGAAGAAAGTGGCGGTGGT
TCGTACGCCGCAAAAAGCCCGAGCTCTGCCAAGAGCCGTTGCAAACCGCTCCTGTGCCGATGCCGG
ACCTGAAGAACGTTAAGTCTAAAATCCGGTAGCACCGGAAATCTGAAGCACCACCTGGTGGCGTTAAG
GTTCAAATCATCAAAAAAGCTGGACTTGAGCAATGTACAAAAGCAAGTGTGGTAGCAAGGACAATAT
CAAAACGTCCTCCGGTGGTGGTTCCTGTCAGATTTGTGTACAAAACCGGTGGACTGAGCAAGTTACCA
GCAATCCGGTTCCCTGGGTAACATCCATCATAAAACCGGGTGGCGGCAAGTTGAGTCAAGAGCGAG
AAACTGGACTTCAAAGACCGGTTTCAGTCCAAAATCGGTTCTCTGGACAACATTAACGCACGTGCCTGG
TGGTGGCAACAAGAGATTGAAACCCATAAATGACGTTTTCGTGAAAATGCGAAGGCGAAAACCGACC
ACGGCGCAGAGATTGTCTACAAAAGCCCGGTGGTGGAGCGGTGATACCAGCCCGCTCACCTGTCCAAC
GTCAGCAGCACGGGACGATTTGATATGGTGGATAGCCCGCAGTTGGCTACGCTGGCCGATGAGGTTAG
CGCGAGCCTGGCGAAGCAGGGTCTGTGACTCGAGCACACCACCACCACACTGAGATCCGCGCTA
 ACAAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGG
 GCCTCTAAACGGGTCTTGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

Фиг. 9

A) Экспрессированная последовательность pET 6His-TEV-hTau
 iso3 (1-383), содержащая участок 6His tag-TEV (SEQ ID NO: 43)

MGS SHHHHHSS GENLYFQGS AEP RQEF EVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEEA
 GTGDTPSLEDEAAGHV TQAR MVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRI PAK
 TPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSR
 LQTAPVMPD LKNVSKIGSTENLKHQPGGKVQI INK KLDLSNVQSKGSKDNI KHVPGGGSVQIVY
 KPV DLSKVT SKCGSLGNI HHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKI GSLDNI THVPGGGNKKIETHKLT
 FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL

B) Конечная последовательность pET 6His-TEV-hTau iso3 (1-383)
 после TEV расщепления (SEQ ID NO: 44)

GSAEP RQEF EVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEEAGI GDTPSLEDEAAGHV TQ
 RMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRI PAKTPPAPKTPPSSGEPKSGD
 RSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSR LQTAPVMPD LKNVSKIG
 STENLKHQPGGKVQI INK KLDLSNVQSKGSKDNI KHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNI
 HKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKI GSLDNI THVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSP
 VVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL

Фиг. 10

Конструкция ДНК, кодирующей изоформу 4 Тау человека для экспрессии в *E. coli* (pET 6His TEV-hTau iso 4 (1-352)) (SEQ ID NO: 45)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
CCGCTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTT
GCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCA
CCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTTTACGTTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT
TTCGCCCTTTTACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACGGAAACAACACTC
AACCCCTATCTCGGTCTATTTCTTTTGTATTTATAAGGGATTTTGCAGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAA
TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAAATTTACGGTGGCA
CTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
CTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACA
TTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCGAAACGC
TGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAAC
AGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT
GCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATT
CTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
GAATTTAGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCTTGTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACA
ACGTTGCGCAACTATTAACGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGAT
GGATGGGATGATAAGTTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGTGGCTGGTTTATGTGATA
AATCTGGAGCCGGTGGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTACGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
GATAGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACTGTGACCAAGTTTTACTCATATATACTTTAGATTG
ATTTAAAACTTCATTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACAAA
ATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTACAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
AGATCTTTTTTCTGCGCTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGTGGTTTT
GTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGACAGCGCAGATACCA
AATACTGCTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTCAAGAACCTCTGTAGCACCCGCTACATA
CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGG
ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCC
AGCTTTGGAGCGAACGACCTACCCGAACCTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT
TCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGG
AGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
GTTCCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCCATGTTCTTCTCCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATA
ACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGAGCGAGTCA
GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACA
CCGCATATATGGTCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCG
STATCGCTACGTGACTGGGTCTGCGCCCCGACACCCGCCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACG
GGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGA
GGTTTTACCGTCACTACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGTGAAGC
GATTCACAGATGTCTGCCTGTTTATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTG
GCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAG
GGGATTTCTGTTTATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACT
GATGATGAACATGCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGCGGGGA
CCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCTGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTA
GCCAGCAGCATCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGA
CTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTCATGTTGTTGCTCAGGTGCGAGACGTTTTGCAGCAGCA
GTCGCTTACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCTGCTAACCAGTAAAGGCAACCCCGCCAGCCTA
GCCGGTCTTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCC
TGCTTCTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACCACTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGGTGCAAGATTC

GAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCCGCCGAAAATGACCC
 AGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATA
 GTCATGCCCGCGCCACCAGGAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTTCGAGATCC
 CGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTCGCTTGCCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAA
 ACCTGTCTGCGCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTGCCTATTGGCGC
 CAGGGTGGTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCTGGCCCTGAG
 AGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCTCAGCAGGCGAAAATCTGTTTGTGGTGGTTAAC
 GGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCCGTATCGTATCCCACTACCAGATGTCCGCACCAACGCG
 CAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTCGCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAG
 TGGGAACGATGCCCTCATTAGCATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCCT
 TCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACG
 CGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCCGTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCAATGCGACCAGATGCT
 CCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACA
 TCAAGAAAACCGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCTGGTTCATCCAGCGG
 ATAGTTAATGATCAGCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCGCTTTACAGGCTTCGA
 CGCCGCTTCGTTTACCATCGACACCACCAGCTGGCACCAGTTGATCGCGCGAGATTTAATCGCC
 GCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTT
 GCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTT
 CCCGCGTTTTTCGAGAAACGTGGCTGGCTGGTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCG
 GCATATCTCGGACATCGTATAACGTTACTGGTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGG
 GCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCCC
 TTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCGGTTGAGCACCGCCGCGCAAG
 GAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGCCACGGGGCTGCCACCATACCCACGC
 CGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTCCCCATCGGTGATGTCCGGCATATAG
 GCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGTTGATGCCGCGCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGAT
 CGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCTC
 TAGAAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGCTCAAGCCACCACCACCACC
ACAGCAGCGGGCAGAACTTGTACTTTCAAGGATCCGCGAACCACGTCAGAATTTGAGGTTATGGAA
GATCACCGGGCACTTACGGTTTGGGTGATCGTAAAGACCAGGGCGGCTATACCATGCATCAAGATCA
AGAGGGCGACACCGATGCTGGCTTGAAGCAGAAGAGGGCGGTTATCGGCGACACTCCGTCCTGGAA
ATGAGGCAGCCGGTCATGTACGCAGGCGCGTATGGTGAGCAAGAGCAAAGATGGTAGCGGATGCGGAC
GACAAGAAGGGCAAGGGCGCAGATGGCAAGACCAAAATTCGCGACGCGCGTGGTGGCGCACCGCCAGG
CCAGAAAGGTGAGGCGAATGCCACGCGCATCCCGGCAAAGACGCCACCGGCTCCGAAAACCCCGCTT
CCAGCGGTGAACCGCGAAATCCGGTGAACCGCAGCGGTTATAGCTCTCCGGGTAGCCGGGTACCCCA
GGCAGCCGTAGCCGACCCCGAGCCTGCCGACCCACCGACCCGCGAGCCGAAAGAAAGTGGCGGTGGT
TGCTACCGCCGCAAAAAGCCGAGCTCTGCCAAGAGCCGCTCTGCAAACCGCTCCTGTGCCGATGCCG
ACCTGAAGAAGCTTAAAGTCTAAAATCGGTAGCACCGAAAATCTGAAGCACCACCTGGTGGCGGTAAG
GTCCAGATTGTGTACAAACCGGTGGACCTGAGCAAGGTTACCAGCAAATGCGGTTCCCTGGGTAACAT
CCATCATAAACCGGGTGGCGGCCAAGTTGAGGTCAGAGCGGAAACTGGACTTCAAAGACCGCGTTC
AGTCCAAAATCGGTTCTCTGGACAACATTACGCACGTCGCTGGTGGTGGCAACAAGAAGATTGAAACC
CATAAATGACGTTTTCTGAAAATGCGAAGCGGAAAACCGACCGCGCAGAGATTGCTACAAAAG
CCCGTGGTGAGCGGTGATACAGCCCGCTCACCTGTCCAACGTCAGCAGCACCGGCGAGATTGATA
TGGTGGATAGCCCGAGTTGGCTACGCTGGCCGATGAGGTTAGCGCGAGCCTGGCGAAGCAGGGTCTG
TGACTCGAGCACACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTT
 GGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTT
 TTTTGTGAAAGGAGGAACATATCCGGAT

Фиг. 11

Экспрессированная аминокислотная последовательность для
 А) рЕТ 6His-TEV-hTau iso4(1-352), содержащая участок 6His tag-
 TEV, - hTau (1-352) (SEQ ID NO: 46)

MGSHHHHHHSSGENLYFQGSAPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEA
 GIGDTPSLEDEAAGHVTAQARMVSKSKDGTGSDDKAKAGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPAK
 TTPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSR
 LQTAPVMPDLKNVSKISSTENLKHQPPGGKVQIVYKPVVLSKVTSCKCSLGNIHHPGGGQVEVKS
 EKLDKDRVQSKIISLDNI THVPPGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLS
 NVSSTGSDIMVDS PQLATLADEVASLAKQGL

В) Конечная последовательность рЕТ 6His-TEV-hTau iso4(1-352)
 после TEV расщепления (SEQ ID NO: 47)

GSAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTAQ
 RMVSKSKDGTGSDDKAKAGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGD
 RSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSR LQTAPVMPDLKNVSKIG
 STENLKHQPPGGKVQIVYKPVVLSKVTSCKCSLGNIHHPGGGQVEVKS EKLDKDRVQSKIISLDNI
 THVPPGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLS NVSSTGSDIMVDS PQLATL
 ADEVASLAKQGL

Фиг. 12

Конструкция ДНК, кодирующей изоформу 5 Тау человека для экспрессии в *E. coli* (pET 6His TEV-hTau iso 5 (1-412)) (SEQ ID NO: 48)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
 CCGCTACACCTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTTC
 GCCGGCTTTCCTCCGTCAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCA
 CCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGTTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT
 TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACAACACTC
 AACCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAA
 TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGCAATTTAACAAAAATTTAACGTTTACAATTTCAAGGTGGCA
 CTTTTTCGGGAAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGATCCG
 CTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACACA
 TTTCCGTGTGCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTTCCTCACCCAGAAACGC
 TGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAAC
 AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCT
 GCTATGTGGCGGGTATTATCCCCTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATT
 CTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCACTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
 GAATTAATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
 AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGG
 AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACA
 ACGTTGCGCAACTATTAACCTGGCGAACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGAT
 GGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATGCTGATA
 AATCTGGAGCCGGTGAAGCTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
 CGTATCTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
 GATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGTAACCTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
 ATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAA
 ATCCCTTAAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
 AGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACACCCGCTACCAGCGGTGGTTTT
 GTTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA
 AATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATA
 CTTGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGG
 ACTCAAGACGATAGTTACCAGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCC
 AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT
 TCCCGAAGGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGG
 AGCTTCCAGGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
 CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACG
 GTTCTTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATA
 ACCGTATTACCAGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
 GTGAGCGGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACA
 CCGCATATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCG
 STATCGCTACGTACTGGGTCTATGGCTGCGCCCGACACCCGCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACG
 GGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGA
 GGTTTTACCGTCTATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAGCTCATCAGCGTGGTCTGTAAGC
 GATTCACAGATGTCTGCCTGTTTCATCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTG
 GCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAG
 GGGGATTTCTGTTTATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTACT
 GATGATGAACATGCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGA
 CCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCTGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTA
 GCCAGCAGCATCTGCGATGACAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGA
 CTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTGCGAGACGTTTTCAGCAGCA
 GTCGCTTACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAAGTAAGGCAACCCCGCAGCCTA
 GCCGGTCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCC
 TGCTTCTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACCACTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTCAAGATTC

GAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAAATGACCC
 AGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAACAGTCATAAGTGCCGGCAGCATA
 GTCATGCCCGCGCCACCAGGAGGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCC
 CGGTGCCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAA
 ACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGC
 CAGGGTGGTTTTTCTTTCCACAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCCAGCCTGGCCCTGAG
 AGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTGCCCCAGCAGCGGAAAATCCTGTTTGTATGGTGGTTAAC
 GCGGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCG
 CAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGGCCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAG
 TGGGAACGATGCCCTCATTAGCATTTCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCT
 TCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGAGACG
 CGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCT
 CCACGCCAGTCGCTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACA
 TCAAGAAATAACCGCGAACATTAAGTGCAGGACGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGG
 ATAGTTAATGATCAGCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCGCTTTACAGGCTTCGA
 CGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCGCTGGCACCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCC
 GCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTT
 CCCCAGCTGTTGTGTCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTT
 CCGCGTTTTTCGAGAAACGTTGGCTGGCTGGTTCCACCACGGGAAACGCTCTGATAAGAGACACCG
 GCATCTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCLCATTCACCACCTGAATGACTCTCTCCGG
 GCGCTATCATGCCATACCGGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCC
 TTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAG
 GAATGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGCCACGGGGCCTGCCACCATCCACACGC
 CGAAACCAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGGATATAG
 GCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCGGTGATGCCGGCCAGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGAT
 CGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCGCCCTC
 TAGAAATAATTTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT**ATGGGCTCAAGCCACCACCACCACC**
ACAGCAGCGCGGAGAACTTGTACTTTCAAGGATCCGAGAACCCAGTCAAGAATTTGAGGTTATGGAA
GATCACGCGGGCACTTACGGTTTGGGTGATCGTAAAGACCAGGGCGGCTATACCATGCATCAAGATCA
AGAGGGGACACCGATGCTGGCTTGAAGAGTCGCCGCTGCAGACTCCGACCGAGGATGGCAGCGAAG
AGCCGGGCGAGCGACTAGCGATGCGAAGTCGACCCCGACCGCGAGGAGGAGGGCGGTTATCGGC
GACTCCGTCCTGGAAGATGAGGCAGCCGGTCAATGTCACGCAGGCGGTATGGTGAGCAAGAGCAA
AGATGGTACGGGTAGCGACGACAAGAAGGCGAAGGGCGCAGATGGCAAGACCAAATTCGCGACGCGC
GTGGTGGGACCGCCAGGCCAGAAAGGTGAGGCGAATGCCACGGCATCCCGGCAAAGACGCCACCG
GCTCCGAAAACCCCGCTTCCAGCGGTGAACCGCGAAATCCGGTGACCGCAGCGGTTATAGCTCTCC
GGGTAGCCCGGTTACCCAGCGAGCGTAGCCGACCCCGAGCCTGCCGACCCACCGACCCGCGAGC
CGAAGAAAGTGGCGGTGGTTCTGACCGCCCAAAAAGCCGAGCTCTGCCAAGAGCCGTCTGCAAAAC
GCTCCTGTGCCGATGCCGGACCTGAAGAAGCTTAAGTCTAAAATCGGTAGCACCGAAAATCTGAAGCA
CAAACCTGGTGGCGGTAAGGTTCAAATCATCAACAAAAGCTGGACTTGAGCAATGTACAAAGCAAGT
GTGGTAGCAAGGACAATATCAAACACGTCGCCGGTGGTGGTTCCGTCCAGATTGTGTACAAACCGGTG
GACCTGAGCAAGGTTACCAGCAAATGCGGTTCCCTGGGTAAACATCCATCATAAACCGGGTGGCGCCA
AGTTGAGGTCAAGAGCGAGAACTGGACTTCAAAGACCGCGTTCAAGTCCAAAATCGGTTCTCTGGACA
ACATTACGCACGTGCCTGGTGGTGGCAACAAGAAGATTGAAACCCATAAACTGACGTTTTCTGAAAAT
GCGAAGGCGAAAACCGACCAGGGCGAGAGATTGTCTACAAAAGCCGGTGGTGAGCGGTGATACCAG
CCGCGGTACCTGTCAAACGTGAGCAGCAGGGCAGCATTGATATGGTGGATAGCCCGCAGTTGGCTA
CGCTGGCGATGAGGTTAGCGCGAGCCTGGCGAAGCAGGGTCTGTGACTCGAGCACCCACCACCAC
 CACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA
 ACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGCTTGGAGGGTTTTTGTGCTGAAAGGAGGAACTATAT
 CCGGAT

Фиг. 13

А) Экспрессированная аминокислотная последовательность для рЕТ 6His-TEV-hTau iso5(l-412), содержащая участок 6His tag-TEV - hTau (1-412) (SEQ ID NO: 49)

MGSSHHHHHSSGENLYFQGSAPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPL
 QTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKGA
 DGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRI PAKTPPAKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTP
 SLPTPPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQI INKK
 LDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDR
 VQSKI GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNV SSTGSI
 DMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL

В) Конечная последовательность для рЕТ 6His-TEV-hTau iso5(l-412) после TEV расщепления (SEQ ID NO: 50)

GSAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAK
 STPTAEAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQ
 QANATRI PAKTPPAKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPPTREPKKVAVVRTP
 PKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQI INKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV
 PGGGSVQIVYKPVDSLKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKI GSLDNITHVPGGGN
 KKIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNV SSTGSI DMVDS PQLATLADEV SASL
 AKQGL

Фиг. 14

Конструкция ДНК, кодирующая изоформу 2 Тау человека для экспрессии у млекопитающих (pMH-10His-TEV-hTau iso2(1-441)) (SEQ ID NO: 51)

GCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTTTGAGATTTCTGTGCGCCGACTAAATTCATGTCCG
CGCGATAGTGGTGTATATCGCCGATAGAGATGGCGATATTGGAAAAATCGGCGGCCGCCGATATTTGA
AAATATGGCATAATGAAAAATGTGCGCCGATGTGAGTTTCTGTGTAACGACATCGCCATTTTTCCAAAA
GTGATTTTTGGGCATACGCGGTATCTGGCGATAGCGCTTATATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACG
ACTTTGGTGACTTGGGCGATTCTGTGTGTCGCAAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATAT
GAGGCTATATCGCCGATAGAGGCGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTG
AATCAATATTTGGCCATTAGCCATATTATTCAATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTTGGCTATTGGCC
ATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCAT
GTTGACATTTGATTTTACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAAGTTTCATAGCCCATAT
ATGGAGTTCGCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAAGACCCCGCC
ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGG
ATGTTTGGCAGTAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGGCCAAGTACCGCCCTT
ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCC
TACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCACTCGCTATTACATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCA
ATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGT
TCCGATTCGACCAAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTAACAACTCCGCCCATTTACCGCCAT
GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAAGTCTGTTAGTGAACCGTCAGATCGCCT
GGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGGGCCGG
GAACGGTGCATTGGAACGCGGATTTCCCGTGCACAGAGTACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAG
GCCGATCCACGCAATCTATGCACTACTACTGTTTTGGCTTGGGGTCTATACCCCATTTCCCGCTTCC
TCATGTTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGGTTATTGACCATTATTGACCACTCCCC
TATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCATAACATGGCTCTTTGCCACAACCTCTTTTATTGGCT
ATATGCCAATACACTGTCTCTCAGAGACTGACACGGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGGTCTCATTT
ATTTATTTACAAATTCACATATACAACACCACCGTCCCGAGTGGCCGCGATTTTTATTAAACATAACGT
AGCGATCTCCACGCAATCTAGGGTACGTGTTACGGACATGGGCTATTTCTCAGGTAGCGCGGCTTCT
TACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGAATCATGGTCTGCGCGCAGCTCCTTGCTCCTAACAG
TGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCAGGATGCCACCACCACAGTGTGCCGCACAAGGCCGTGGCGGTA
GGGTATGTGTCTGAAAATGAACTAGGGGAGCGGGCTTGCACCGCTGACGCATTTGGAAGACTTAAGGC
AGCGGCAGAAAGATGCAGGCAACTGAGTTGTTGTGTTCTGATAAGAGTCAAGGTAACCTCCCGTTG
CGGTGCTGTTAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCACGCGCCACCAGA
CATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCTCTTCAATGGGTCTTTTATGCAGTCAACGCTCTTTGACA
CGAAGCTTGCCACCATGGGCTCAAGCCACCATCACCACCACCATCATCACCACCACAGCAGCGGGCAG
AACTTGTACTTTCAAGGATCCGCTGAGCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGTGGAAGATCAGCGTGGGAC
GTACGGGTTGGGGACAGGAAAGATCAGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGCACCGG
ACGCTGGCCTGAAAGAATCTCCCTGCAGACCCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACGGGGCTCTGAA
ACCTCTGATGCTAAGAGCACTCCAACAGCGGAAGATGTGACAGCACCCTTAGTGGATGAGGGAGCTCC
CGGCAAGCAGGCTGCCGCGCAGCCCAACAGGAGATCCCGAAGGAACCAAGCTGAAGAAGCAGGCA
TTGGAGACACCCCAAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCAAGTACCCCAAGCTCGCATGGTCAAGTAA
AGCAAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAAGCCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAAGATCGCCAC
ACCGCGGGGAGCAGCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGGATTCAGCAAAAACCC
CGCCCGCTCCAAAGACACCAACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGC
AGCCCGGGCTCCCAAGCACTCCCGGCAGCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCG
GGAGCCCAAGAAGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCCCGCTCTTCCGCCAAGAGCCGCTGC
AGACAGCCCCCGTCCCATGCCAGACTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTG
AAGCACCAAGCCGGGAGCGGGAAGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACCTCAGT
CAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGGCGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAC
CAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACAGGAGGT
GGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTAGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCAAGATTTGGGTCCCT
GGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCCAAGCTGACCTTCCGGC
AGAACGCCAAAGCAAGACAGACCAGGGGGGAGATCGTGTACAAGTCCCGAGTGGTGTCTGGGGAC
ACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGACTCGCCCCAGCT
CGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTGTGACTCGAGGAGAACTTGT

ACTTCCAGGGAAGTGGTGGCAGTCATCACCATCACCATCACCATCACCATCACTGAGAATTCATTGAT
 CATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGA
 ACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTTGTTGTTAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAAA
 TAAAGCAATAGCATCACAAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATCTAGTTGTGGTTTTGTC
 CAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGAATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATACCG
 GCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCAC
 TTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCTGGCCGGGGACTGTTGGG
 CGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCCTTGGCGCGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCT
 GCTTCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCTGACTGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGC
 CCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTCTCGCCGCCAAGCATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGAT
 CAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGC
 TTGGTGGGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGT
 TCCGGCTGTACGGCAGGGGCGCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACTGTCCGGTCCCTGAATGAA
 CTGCAAGACAGGCGAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCTTCTTGGCGCAGCAGTGTCTGGA
 CGTTGCTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTTGGGCAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCT
 CTCCCTTGCCTTCCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGGCGCTGCATGGCTGAT
 CCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGC
 CGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCCGAGCCGAACCTTTCGCCA
 GGCTCAAGGGCAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCACGGGATGCCTGCTTCCGCAAT
 ATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTTCTGGATTCTGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGTGGCGGTA
 TCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCC
 TCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTC
 TTCTGAATTTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGATTTTC
 ACACCGCATCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAAACCCCTATTTGTTTATTTTCAAATA
 CATTTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAA
 ACTTCTATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
 AACGTGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCT
 TTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCACAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTGTTTTGCC
 GGATCAAGAGCTACCAACTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCCAGCAGCGCAGATACCAATACTG
 TTCTTCTAGTGTAGCCGATGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCT
 CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAG
 ACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGG
 AGCGAACGACTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
 GGGGAAAGCGGACAGGATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
 AGGGGAAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCCGCACCTCTGACTTGAGCGTCAATTTT
 TGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACCGCGGCTTTTTACGGTTCTCTG
 GCCTTTTGTGCGCTTTTGTCTCACATGTTCTT

Фиг. 15

Экспрессированная аминокислотная последовательность для
А) рМН 10His-TEV-hTau iso2(l-441), содержащая участок 10His tag-
TEV, - hTau (1-441) (SEQ ID NO: 52)

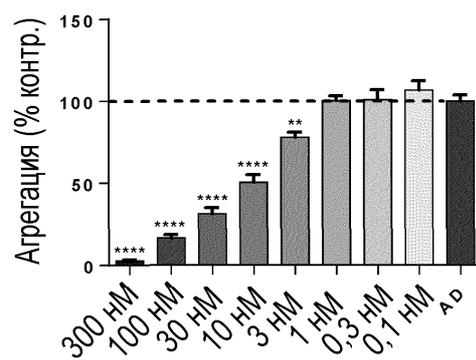
MGSSHHHHHHHHSSGENLYFQGSAPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK
 ESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEAEAGIGDTP
 SLEDEAAGHVTVQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIPAKTPPAPK
 TTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPLSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPV
 PMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVVLS
 KVTSKCGSLGNIHHPGGQVEVSEKLDLDFKDRVQSKI GSLDNI THVPGGNKKIETHKLTFRENAKA
 KTDHGAIEIVYKSPVVS GDTSPRHLNSVSTGSI DMVDS PQLATLADEVSSASLAKQGL

В) Конечная последовательность для рМН 10His-TEV-hTau
iso2(l-441) после TEV расщепления (SEQ ID NO: 53)

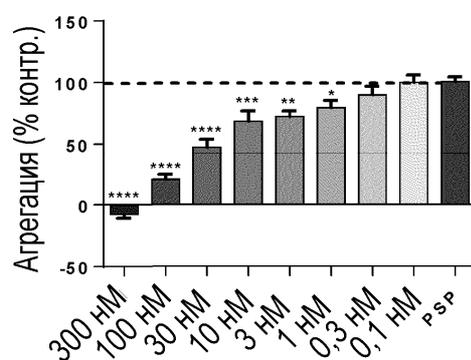
GSAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAK
 STPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTVQARMVSKSKDGT
 GSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSP
 GTPGSRRTPLSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPG
 GGVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVVLSKVTSKCGSLGNIHHPGGQVEV
 KSEKLDLDFKDRVQSKI GSLDNI THVPGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAIEIVYKSPVVS GDTSPR
 HLSNVSTGSI DMVDS PQLATLADEVSSASLAKQGL

Фиг. 16

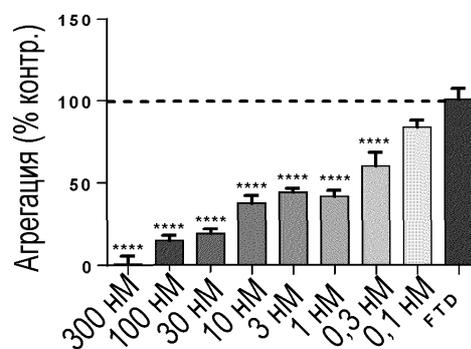
AD



PSP



FTD



Фиг. 17



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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