

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041230**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.28

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892412

(22) Дата подачи заявки
2017.05.02

(54) АНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ ТАУ

(31) **62/330,800**

(32) **2016.05.02**

(33) **US**

(43) **2019.05.31**

(86) **PCT/IB2017/052545**

(87) **WO 2017/191561 2017.11.09**

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

(72) Изобретатель:
**Барбур Робин, Долан Филип Джеймс,
Лю Юэ (US)**

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

(56) WO-A1-9615452
WO-A2-2014152157
WO-A1-2013004717
US-A1-2008050383
WO-A1-2013041962
WO-A2-2014100600
WO-A2-2014165271
WO-A1-2016079597

Olivier Léger ET AL.: "Antibody Drug
Discovery Chapter 1: "Humanization of Antibodies",

In: "Molecular Medicine and Medicinal Chemistry",
1 January 2011 (2011-01-01), XP055119233, p. 1-23,
the whole document

ALMAGRO JUAN C. ET AL.: "Humanization
of antibodies", FRONTIERS IN BIOSCI,
FRONTIERS IN BIOSCIENCE, ALBERTSON, NY,
US, vol. 13, 1 January 2008 (2008-01-01), p.
1619-1633, XP009126790, ISSN: 1093-9946, the
whole document

LAZAR ET AL.: "A molecular
immunology approach to antibody humanization
and functional optimization", MOLECULAR
IMMUNOL, PERGAMON, GB, vol. 44, № 8,
1 December 2006 (2006-12-01), p. 1986-1998,
XP005792736, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/
J.MOLIMM.2006.09.029, the whole document

WU H. ED. - HEISER ET AL.:
"SIMULTANEOUS HUMANIZATION AND
AFFINITY OPTIMIZATION OF MONOCLONAL
ANTIBODIES", METHODS IN MOLECULAR BIO,
HUMANA PRESS, US, vol. 207, 1 January 2003
(2003-01-01), p. 197-212, XP009052628, ISSN:
1064-3745, the whole document

Glenn E. Morris: "Epitope Mapping of
Protein Antigens by Competition ELISA", In:
"The Protein Protocols Handbook", 1 January
1996 (1996-01-01), Humana Press, Totowa,
NJ, XP055007939, ISBN: 978-1-60-327259-9, p.
595-600, DOI: 10.1007/978-1-60327-259-9_96, the
whole document, see in particular abstract; p. 595

(57) Изобретение относится к выделенному моноклональному антителу, содержащему три CDR тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 7, и три CDR легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 11, при условии, что положение 31 тяжелой цепи занимает S или G, положение 60 тяжелой цепи занимает N или A и положение 64 тяжелой цепи занимает K или Q, где положения пронумерованы согласно определению Кэбота, и к его антигенсвязывающему фрагменту. Антитело и его фрагмент связываются с тау-белком человека и способны лечить вызванные тау заболевания. Изобретение также относится к фармацевтической композиции, нуклеиновым кислотам, вектору экспрессии, клетке-хозяину, способам получения антитела и клеточной линии, способам ингибирования или снижения агрегации тау-белка у субъекта, лечения или осуществления профилактики вызванного тау-белком заболевания у субъекта и способу обнаружения отложений тау-белка у субъекта.

B1**041230****041230 B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно разделу 35 §119(e) Свода законов США на основании предварительной заявки США № 62/330800, поданной 2 мая 2016 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Ссылка на перечень последовательностей

Перечень последовательностей, записанный в файле 497448SEQLIST.txt, составляет 59 килобайт, был создан 2 мая 2017 г. и включен в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

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

Тау является важнейшим компонентом нейрофибриллярных клубков, которые наряду с бляшками являются характерным признаком болезни Альцгеймера. Клубки образуют аномальные фибриллы, которые составляют 10 нм в диаметре, встречающиеся в парах и перевивающиеся спиральным образом с регулярной периодичностью 80 нм. Тау в нейрофибриллярных клубках является аномально фосфорилированным (гиперфосфорилированным), причем фосфатные группы присоединены к специфичным сайтам на молекуле. При болезни Альцгеймера значительное присутствие нейрофибриллярных клубков наблюдается в слое II нейронов энторинальной области коры, в областях CA1 и областях опорной структуры гиппокампа, миндалевидного тела и в более глубоких слоях (слои III, V и поверхностный VI) неокортекса. Также сообщалось, что гиперфосфорилированный тау препятствует сборке микротрубочек, что может вызвать разрушение нейронной сети.

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

Краткое описание заявляемого изобретения

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложено выделенное моноклональное анти тело, которое специфично связывается с тау. Примеры таких антител связываются с эпитопом в пределах остатков аминокислот 55-78, 60-75 или 61-70 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 113-136, 118-133 или 119-128, соответственно, SEQ ID NO: 1).

Некоторые такие антитела конкурируют с антителом 16G7 за связывание с тау человека. Некоторые такие антитела связываются с тем же эпитопом на тау человека, что и 16G7.

Некоторые антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 16G7, причем 16G7 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 7, и вариабельной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 11. В некоторых антителах три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 8, 9 и 10), и три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 12, 13 и 14).

Например, антитело может представлять собой 16G7 или химерную, венированную или гуманизированную форму указанного антитела. В некоторых таких антителах вариабельная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых таких антителах вариабельная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых таких антителах каждая из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$. В некоторых таких антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи, которые являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 8, 9 и 10), и три CDR легкой цепи, которые являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 12, 13 и 14); при условии, что положение H31 занимает S или G, положение H60 занимает N или A и положение 64 занимает K или Q. В некоторых таких антителах CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 49. В некоторых таких антителах CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 50. В некоторых таких антителах CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 51. В некоторых таких антителах антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых таких антителах CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность, содержа-

щую SEQ ID NO: 49, и CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 50. В некоторых таких антителах CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 49, и CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 51.

Некоторые антитела представляют собой гуманизированное или химерное антитело 16G7, которое специфично связывается с тау человека, причем 16G7 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 11. Некоторые такие антитела представляют собой гуманизированное антитело, содержащее гуманизированную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR тяжелой цепи 16G7, и гуманизированную зрелую вариабельную область легкой цепи, которая содержит три CDR легкой цепи 16G7. В некоторых таких антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения.

В некоторых таких антителах гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 16G7 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 8-10) и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 16G7 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 12-14).

В некоторых таких антителах гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 16G7 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10) и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 16G7 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 12-14).

В некоторых таких антителах гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 16G7 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 10) и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 16G7 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 12-14).

В некоторых таких антителах гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 16G7 согласно AbM (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 10) и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 16G7 согласно AbM (SEQ ID NO: 12-14).

В некоторых таких антителах гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 16G7 согласно контактному определению (SEQ ID NO: 46-48) и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 16G7 согласно контактному определению (SEQ ID NO: 43-45).

В некоторых антителах гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 15-27, и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 28-30.

В некоторых таких антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H5 занимает Q, H7 занимает P, H9 занимает S, H19 занимает V, H11 занимает L, H12 занимает V, H13 занимает R, H20 занимает L, H40 занимает R, H48 занимает I, H66 занимает K, H67 занимает A, H69 занимает L, H71 занимает V, H73 занимает I, H75 занимает S, H80 занимает V, H82a занимает T, H82b занимает S, H83 занимает T, и H85 занимает E. В некоторых таких антителах положения H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают E, Q, P, S, V, L, V, R, L, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T и E соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H5 занимает Q, H7 занимает P, H9 занимает S, H10 занимает V, H11 занимает L, H12 занимает V, H13 занимает R, H20 занимает L, H48 занимает I, H69 занимает L, H71 занимает V, H82a занимает T, H82b занимает S, H83 занимает T, и H85 занимает E. В некоторых антителах положения H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H48, H69, H71, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают E, Q, P, S, V, L, V, R, L, I, L, V, T, S, T и E соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H5 занимает Q, H11 занимает L, H12 занимает V, H20 занимает L, H48 занимает I, H69 занимает L, H71 занимает V, H82a занимает T, H82b занимает S, H83 занимает T, и H85 занимает E. В некоторых антителах H1, H5, H11, H12, H20, H48, H69, H71, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают E, Q, L, V, L, I, L, V, T, S, T и E соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H12 занимает V, H31 занимает G, H40 занимает R, H48 занимает I, H60 занимает A, H69 занимает L, H73 занимает I, и H83 занимает T. В некоторых антителах положения H1, H12, H31, H40, H48, H60, H69, H73 и H83 в области VH занимают E, V, G, R, I, A, L, I и T соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает

аминокислота, как указано: Н1 занимает Е, Н12 занимает V, Н40 занимает R, Н48 занимает I, Н69 занимает L, Н73 занимает I, и Н83 занимает Т. В некоторых антителах положения Н1, Н12, Н40, Н48, Н69, Н73 и Н83 в области VH занимают Е, V, R, I, L, I и Т соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: Н1 занимает Е, Н12 занимает V, Н40 занимает R, Н48 занимает I, Н66 занимает K, Н67 занимает A, Н69 занимает L, Н71 занимает V, Н73 занимает I, и Н83 занимает Т. В некоторых антителах положения Н1, Н12, Н40, Н48, Н66, Н67, Н69, Н71, Н73 и Н83 в области VH занимают Е, V, R, I, K, A, L, V, I и Т соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: Н1 занимает Е, Н12 занимает V, Н40 занимает R, Н48 занимает I, Н69 занимает L, Н73 занимает I, и Н83 занимает Т.

В некоторых антителах положения Н1, Н12, Н40, Н48, Н69, Н73 и Н83 в области VH занимают Е, V, R, I, L, I и Т соответственно. В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: Н7 занимает Р, Н71 занимает V, и Н73 занимает I.

В некоторых антителах положения Н7, Н71 и Н73 в области VH занимают Р, V и I соответственно. В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: Н31 занимает G, и Н60 занимает A.

В некоторых антителах положения Н31 и Н60 в области VH занимают G и A соответственно. В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: Н1 занимает Q или Е, Н5 занимает V или Q, Н7 занимает S или Р, Н9 занимает A или S, Н10 занимает Е или V, Н11 занимает V или L, Н12 занимает K или V, Н13 занимает K или R, Н20 занимает V или L, Н31 занимает G или S, Н37 занимает V или A, Н 38 занимает R или K, Н40 занимает A или R, Н48 занимает M или I, Н60 занимает A или N, Н64 занимает Q или K, Н66 занимает R или K, Н67 занимает V или A, Н69 занимает M или L, Н71 занимает R или V, Н73 занимает T или I, Н75 занимает I, S, или A, Н80 занимает M или V, Н82a занимает S или T, Н82b занимает R или S, Н83 занимает R или T, и Н85 занимает D или E.

В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н7, Н9, Н10, Н11, Н12, Н13, Н20, Н37, Н38, Н40, Н48, Н66, Н67, Н69, Н71, Н73, Н75, Н80, Н82a, Н82b, Н83 и Н85 в области VH занимают Е, Q, Р, S, V, L, V, R, L, A, K, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T и Е соответственно.

В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н11, Н12, Н20, Н48, Н69, Н71, Н75, Н82a, Н82b, Н83 и Н85 в области VH занимают Е, Q, L, V, L, I, L, V, A, T, S, T и Е соответственно.

В некоторых антителах положения Н1, Н12, Н40, Н48, Н66, Н67, Н69, Н71, Н73 и Н83 в области VH занимают Е, V, R, I, K, A, L, V, I и Т соответственно.

В некоторых антителах положения Н1, Н12, Н31, Н40, Н48, Н60, Н66, Н67, Н69, Н71, Н73 и Н83 в области VH занимают Е, V, G, R, I, A, K, A, L, V, I и Т соответственно.

В некоторых антителах положения Н1, Н12, Н40, Н48, Н69, Н73 и Н83 в области VH занимают Е, V, R, I, L, I и Т соответственно.

В некоторых антителах положения Н1, Н12, Н31, Н40, Н48, Н60, Н66, Н67, Н69, Н71, Н73 и Н83 в области VH занимают Q, V, G, R, I, A, K, A, L, V, I и Т соответственно.

В некоторых антителах положения Н1, Н7 и Н73 в области VH занимают Q, Р, V и I соответственно. В некоторых антителах положения Н1, Н12, Н31, Н40, Н48, Н60, Н64, Н69, Н73 и Н83 в области VH занимают Е, V, G, R, I, A, Q, L, I и Т соответственно.

В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н7, Н9, Н10, Н11, Н12, Н13, Н20, Н48, Н69, Н71, Н75, Н82a, Н82b, Н83 и Н85 в области VH занимают Е, Q, Р, S, V, L, V, R, L, I, L, V, A, T, S, T и Е.

В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н11, Н12, Н20, Н48, Н66, Н67, Н69, Н71, Н73, Н75, Н82a, Н82b, Н83 и Н85 в области VH занимают Е, Q, L, V, L, I, K, A, L, V, I, S, T, S, T и Е.

В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н7, Н9, Н10, Н11, Н12, Н13, Н20, Н38, Н40, Н48, Н66, Н67, Н69, Н71, Н73, Н75, Н80, Н82a, Н82b, Н83 и Н85 в области VH занимают Е, Q, Р, S, V, L, V, R, L, K, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T и Е соответственно.

В некоторых антителах положения Н1, Н5, Н7, Н9, Н10, Н11, Н12, Н13, Н20, Н40, Н48, Н66, Н67, Н69, Н71, Н73, Н75, Н80, Н82a, Н82b, Н83 и Н85 в области VH занимают Q, Р, S, V, L, V, R, L, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T и Е соответственно.

В некоторых антителах положения Н7, Н71 и Н73 в области VH занимают Р, V и I соответственно. В некоторых антителах положения Н71 в области VH занимает V.

В некоторых антителах положения Н1, Н7, Н71 и Н73 в области VH занимают Е, Р, V и I.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L4 занимает L, L9 занимает S, L15 занимает V, L22 занимает S, и L43 занимает S. В некоторых антителах положения L4, L9, L15, L22 и L43 в области VL занимают L, S, V, S и S соответственно.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L4 занимает L, L9 занимает S, L15 занимает V, L18 занимает K, L19 занимает V, L21 занимает M, L22 занимает S, и L43 занимает S. В некоторых антителах L4, L9, L15, L18, L19, L21,

пример мутацию в одном или нескольких из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 и 331 согласно нумерации EU. Некоторые антитела содержат аланин в положениях 318, 320 и 322. Некоторые антитела могут являться по меньшей мере на 95% мас./мас. чистыми. Антитело может быть конъюгировано с терапевтическим, цитотоксическим, цитостатическим, нейротрофическим или нейропротекторным средством.

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

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

Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы гуманизации любого антитела, отличного от антитела человека, описанного в настоящем документе, например, антител 16G7 мыши, причем 16G7 характеризуется зрелой вариабельной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7 и зрелой вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 11. Такие способы могут включать отбор одного или нескольких акцепторных антител, синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши, и экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизированного антитела.

Также предложены способы получения антител, таких как гуманизированное, химерное или венированное антитело, например, гуманизированная, химерная или венированная формы 16G7. В таких способах клетки, трансформированные нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела, культивируют так, чтобы клетки секретировали антитело. Затем антитело можно очистить из среды для культуры клеток.

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

Некоторые клетки можно размножить в селективных условиях и провести скрининг в отношении линий клеток, естественным образом экспрессирующих и секретирующих по меньшей мере 100 мг/л/10⁶ клеток/24 ч. Из отобранных клеток можно выделить единичные клетки. Затем клетки, клонированные из единичной клетки, можно использовать для создания банка клеток. Единичные клетки можно отобрать в зависимости от желаемых свойств, таких как выход антитела. Иллюстративные линии клеток представляют собой линии клеток, экспрессирующие 16G7.

В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования или снижения агрегации тау у субъекта, который страдает от опосредованного тау амилоидоза или подвержен риску развития опосредованного тау амилоидоза, причем указанные способы включают введение субъекту эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого ингибирование или снижение агрегации тау у субъекта. Иллюстративные антитела включают гуманизированные версии 16G7.

Также предложены способы лечения или осуществления профилактики вызванного тау заболевания у субъекта, причем указанные способы включают введение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого лечение или осуществление профилактики заболевания. Примерами такого заболевания являются болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа C, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (Lewy body variant of Alzheimer disease, LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). В некоторых способах вызванное тау заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых способах пациент представляет собой носителя ApoE4.

Также предложены способы снижения нарушенной передачи тау, причем указанные способы включают применение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого снижение передачи тау.

Также предложены способы индукции фагоцитоза тау, причем указанные способы включают применение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого индукцию фагоцитоза тау.

Также предложены способы ингибирования агрегации или накопления тау, причем указанные способы включают применение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого ингибирование агрегации или накопления тау.

Также предложены способы ингибирования образования клубков тау, причем указанные способы включают применение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе.

В настоящем изобретении также предложен способ обнаружения отложений тау-белка у субъекта, страдающего от или подверженного риску заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, причем указанные способы включают введение субъекту антитела, раскрытого в настоящем документе, и обнаружение антитела, связавшегося с тау, у субъекта. Примерами такого заболевания являются болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). Согласно некоторым вариантам реализации антитело вводят в организм субъекта посредством внутривенной инъекции. Согласно некоторым вариантам реализации антитело вводят непосредственно в головной мозг субъекта посредством внутричерепной инъекции или посредством сверления отверстия в черепе субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации антитело является меченым. Согласно некоторым вариантам реализации антитело является меченым флуоресцентной меткой, парамагнитной меткой или радиоактивной меткой. Согласно некоторым вариантам реализации радиоактивную метку обнаруживают с применением позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

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

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

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены результаты экспериментов, спланированных для картирования эпитопа или эпитопов, с которыми связывается моноклональное антитело 16G7 мыши.

На фиг. 2 представлено выравнивание переменных областей тяжелой цепи антитела 16G7 мыши и гуманизированных версий антитела 16G7. CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа представлены жирным шрифтом. Положения в переменных областях тяжелой цепи антитела 16G7 мыши и в гуманизированных версиях антитела 16G7, в которых остатки аминокислот отличаются от последовательности "Большинство", заключены в рамку.

На фиг. 3 представлено выравнивание переменных областей легкой цепи антитела 16G7 мыши и гуманизированных версий антитела 16G7. CDR согласно определению Кэбота представлены жирным шрифтом. Положения в переменных областях легкой цепи антитела 16G7 мыши и в гуманизированных версиях антитела 16G7, в которых остатки аминокислот отличаются от последовательности "Большинство", заключены в рамку.

На фиг. 4А и 4В представлены результаты экспериментов, демонстрирующие, что 16G7 иммунным способом захватывает тау из ткани человека, пораженной болезнью Альцгеймера.

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

На фиг. 6 представлена аффинность антитела 16G7 мыши в отношении тау.

На фиг. 7 представлена кинетика связывания химерного антитела 16G7 и гуманизированных антител 16G7 VH2a, VH2b и VH6a H7L2 в отношении тау.

На фиг. 8 представлена авидность Fab-фрагмента 16G7 мыши и интактного антитела 16G7 мыши в отношении агрегированного тау.

Краткое описание последовательностей

В SEQ ID NO: 1 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау человека (Swiss-Prot P10636-8).

В SEQ ID NO: 33 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи акцептора с учетн. № IMGT#IGHV1-2*02.

В SEQ ID NO: 34 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи акцептора с учетн. № AAB24404.1.

В SEQ ID NO: 35 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи акцептора с учетн. № AEK69364.1.

В SEQ ID NO: 36 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи акцептора с учетн. № IMGT#IGKV4-1*01.

В SEQ ID NO: 37 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей варибельную область тяжелой цепи антитела 16G7 мыши.

В SEQ ID NO: 38 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей варибельную область легкой цепи антитела 16G7 мыши.

В SEQ ID NO: 39 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 16G7 мыши согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 40 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 16G7 мыши согласно Чотиа.

В SEQ ID NO: 41 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 16G7 мыши согласно Чотиа.

В SEQ ID NO: 42 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 16G7 мыши согласно AbM.

В SEQ ID NO: 43 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 16G7 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 44 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 антитела 16G7 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 45 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 16G7 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 46 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 16G7 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 47 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 16G7 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 48 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 16G7 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 49 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H1 гуманизированного антитела 16G7 согласно сводному определению Кэбота-Чотиа.

В SEQ ID NO: 50 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H2 гуманизированного антитела 16G7 согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 51 представлена аминокислотная последовательность альтернативного CDR-H2 гуманизированного антитела 16G7 согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 52 представлена консенсусная аминокислотная последовательность варибельных областей тяжелой цепи антитела 16G7 мыши и гуманизированных антител 16G7 (на фиг. 2 отмечена "Большинство").

В SEQ ID NO: 53 представлена консенсусная аминокислотная последовательность между варибельными областями легкой цепи антитела 16G7 мыши и гуманизированных антител 16G7 (на фиг. 3 отмечена "Большинство").

В SEQ ID NO: 54 представлена аминокислотная последовательность тяжелой цепи химерного антитела 16G7.

В SEQ ID NO: 55 представлена аминокислотная последовательность легкой цепи химерного антитела 16G7.

Определения.

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

Специфичное связывание антитела с его антигеном-мишенью означает аффинность и/или авидность, составляющую по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , или 10^{12} M⁻¹. Специфичное связывание является обнаруживаемо более высоким по величине и различным от неспецифичного связывания,

возникающего с по меньшей мере одной неродственной мишенью. Специфичное связывание может являться следствием образования связей между конкретными функциональными группами или конкретной пространственной укладкой (например, по типу замка и ключа), тогда как неспецифичное связывание обычно является следствием вандерваальсовых сил. Однако специфичное связывание не обязательно подразумевает, что антитело связывается с одной и только одной мишенью.

Основной структурной единицей антитела является тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область из приблизительно 100-110 или более аминокислот, отвечающих главным образом за распознавание антигена. Данная вариабельная область изначально экспрессируется связанной с отщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельную область без сигнального пептида иногда называют зрелой вариабельной областью. Таким образом, например, зрелая вариабельная область легкой цепи означает вариабельную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, отвечающую главным образом за эффекторную функцию.

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

Вариабельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (которую также называют в настоящем документе "вариабельный домен легкой цепи" ("домен VL") или "вариабельный домен тяжелой цепи" ("домен VH")) соответственно состоит из "каркасного" участка (framework, FR), который перемежается тремя "участками, определяющими комплементарность" или "CDR" (complementarity determining regions). Каркасные участки служат для выравнивания CDR с целью специфичного связывания с эпитопом антигена. CDR содержат остатки аминокислот антитела, отвечающие главным образом за связывание с антигеном. От аминоконца к карбоксиконцу как домены VL, так и домены VH содержат следующие каркасные (FR) участки и участки CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR 1, 2 и 3 домена VL также называют в настоящем документе соответственно CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; CDR 1, 2 и 3 домена VH также называют в настоящем документе соответственно CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3.

Распределение аминокислот к каждому из доменов VL и VH происходит в соответствии с любым общепринятым определением CDR. Общепринятые определения включают определение Кэбота (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), определение Чотиа (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917, 1987; Chothia et al., *Nature*, 342:878-883, 1989); сводное определение CDR Чотиа и Кэбота, в котором CDR-H1 представляет собой сводное определение CDR Чотиа и Кэбота; определение AbM, используемое в программном обеспечении для молекулярного моделирования антител Оксфордского университета; и контактное определение согласно Martin et al. (bioinfo.org.uk/abs) (см. табл. 1). Определение согласно Кэботу обеспечивает широко используемую систему нумерации (нумерацию Кэбота), в которой соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями присваивают одинаковый номер. Когда говорят, что антитело содержит CDR согласно конкретному определению CDR (например, Кэботу), данное определение указывает на минимальное количество остатков CDR, присутствующих в антителе (т.е. CDR согласно Кэботу). Это не исключает того, что также присутствуют другие остатки, попадающие под другое общепринятое определение CDR, но за пределами указанного определения. Например, антитело, содержащее CDR, определенные согласно Кэботу, включает среди других возможностей антитело, в котором CDR содержат остатки CDR согласно Кэботу и не содержат другие остатки CDR, и антитело, в котором CDR H1 представляет собой CDR H1 согласно сводному определению Чотиа-Кэбота, а другие CDR содержат остатки CDR согласно Кэботу и не содержат дополнительные остатки CDR на основании других определений.

Таблица 1

Общепринятые определения CDR с применением нумерации Кэбота

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

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

Термин "антитело" включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены, за специфичное связывание с мишенью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂c, Dab, нанотела и Fv. Фрагменты можно получить посредством методик рекомбинантной ДНК или посредством ферментативного или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин "антитело" также включает биспецифичное антитело и/или гуманизированное антитело. Биспецифичное или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, которое содержит две различные пары тяжелой/легкой цепей и два различных связывающих сайта (см., например, публикации Song-sivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)). В некоторых биспецифичных антителах две различные пары тяжелой/легкой цепей содержат пару тяжелой цепи/легкой цепи гуманизированного 16G7 и пару тяжелой цепи/легкой цепи, специфичную в отношении отличного эпитопа на тау, чем таковой, с которым связывается 16G7.

В некоторых биспецифичных антителах одна пара тяжелой цепи/легкой цепи представляет собой гуманизированное антитело 16G7, как более подробно раскрыто ниже, а другая пара тяжелой цепи/легкой цепи получена из антитела, которое связывается с рецептором, который экспрессирован на гематоэнцефалическом барьере, таком как инсулиновый рецептор, рецептор инсулиноподобного фактора роста (ИФР), лептиновый рецептор, или липопротеиновый рецептор, или трансферриновый рецептор (Friden et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:4771-4775, 1991; Friden et al., Science, 259:373-377, 1993). Такое биспецифичное антитело может переноситься через гематоэнцефалический барьер в результате рецептор-опосредованного трансцитоза. Поглощение биспецифичного антитела головным мозгом можно дополнительно усилить посредством конструирования биспецифичного антитела с целью снижения его аффинности к рецептору гематоэнцефалического барьера. Сниженная аффинность к рецептору приводила к более широкому распределению в головном мозге (см., например, публикации Atwal et al., Sci. Trans. Med., 3, 84ra43, 2011; Yu et al., Sci. Trans. Med., 3, 84ra44, 2011).

Иллюстративные биспецифичные антитела могут также представлять собой

(1) антитело с двойным варибельным доменом (dual-variable-domain antibody, DVD-Ig), в котором каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержат два варибельных домена в тандеме через короткую пептидную связь (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010));

(2) Tandab (тандемное антитело), которое представляет собой слияние двух одноцепочечных диател с получением тетравалентного биспецифичного антитела, содержащего два связывающих сайта для каждого из антигенов-мишеней;

(3) антитело flexibody, которое представляет собой комбинацию scFv с диателом с получением мультивалентной молекулы;

(4) так называемую молекулу, полученную методом "замка на причале" ("dock and lock"), на основе "домена димеризации и докинга" в протеинкиназе A, которая при применении с Fab позволяет получить тривалентный биспецифичный связывающий белок, состоящий из двух идентичных Fab-фрагментов, присоединенных к отличному Fab-фрагменту; или

(5) так называемую молекулу Scorpion, содержащую, например, два scFv, слитых с обоими концами Fc-области человека.

Примеры платформ, пригодных для получения биспецифичных антител, включают BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab и Mab2 (F-star), Fc-сконструированный IgG1 (Xencor) или Duo-Body (на основе замены плеча Fab, Genmab).

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

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

Конкуренцию между антителами определяют с помощью анализа, в котором исследуемое антитело ингибирует специфичное связывание эталонного антитела с известным антигеном (см., например, публикацию Junghans et al., Cancer Res., 50:1495, 1990). Исследуемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток исследуемого антитела (например, по меньшей мере 2-кратный, 5-кратный, 10-кратный, 20-кратный или 100-кратный) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 50% по результатам измерения в анализе конкурентного связывания. Некоторые исследуемые антитела ингибируют связывание эталонных антител по меньшей мере на 75, 90 или 99%. Антитела, идентифицированные с помощью конкурентного анализа (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным достаточно проксимально по отношению к эпитопу, с которым связывается эталонное антитело, для возникновения стерического барьера.

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

Термин "пациент" включает человека или других субъектов-млекопитающих, получающих профилактическое или терапевтическое лечение.

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

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

Термин "контрольный образец" означает биологический образец, который, как известно или как

подозревают, не содержит области, пораженные вызванным тау заболеванием, или который по меньшей мере, как известно или как подозревают, не содержит пораженные заболеванием области данного типа. Контрольные образцы можно получить от индивидуумов, не страдающих от вызванного тау заболевания. В качестве альтернативы контрольные образцы можно получить от пациентов, страдающих от вызванного тау заболевания. Такие образцы можно получить одновременно с биологическим образцом, который, как считают, содержит вызванное тау заболевание, или в другой раз. Биологический образец и контрольный образец можно получить из одной ткани. Предпочтительно контрольные образцы состоят из по существу или полностью нормальных, здоровых областей и их можно применять при сравнении с биологическим образцом, который, как считают, содержит области, пораженные вызванным тау заболеванием. Предпочтительно ткань в контрольном образце относится к тому же типу, что и ткань в биологическом образце. Предпочтительно пораженные вызванным тау заболеванием клетки, которые, как считают, находятся в биологическом образце, возникают из того же типа клеток (например, нейронов или глии), что и тип клеток в контрольном образце.

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

Термин "симптом" относится к субъективному проявлению заболевания, такому как измененная походка, воспринимаемому субъектом. "Признак" относится к объективному проявлению заболевания, наблюдаемому врачом.

Термин "положительный ответ на лечение" означает более благоприятный ответ у индивидуального пациента или средний ответ в популяции пациентов по сравнению со средним ответом в контрольной популяции, не получающей лечение.

С целью классификации аминокислотных замен на консервативные или неконсервативные аминокислоты сгруппированы следующим образом:

Группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile;

Группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr;

Группа III (кислые боковые цепи): asp, glu;

Группа IV (основные боковые цепи): asn, gin, his, lys, arg;

Группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): gly, pro; и

Группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe.

Консервативные замены включают замены между аминокислотами одного класса. Неконсервативные замены представляют собой замены аминокислот одного класса на аминокислоты другого класса.

Процент идентичности последовательностей определяют с помощью последовательностей антител, максимально выровненных с использованием системы нумерации Кэбота. После выравнивания, если область представляющего интерес антитела (например, полную зрелую вариабельную область тяжелой или легкой цепи), сравнивают с той же областью эталонного антитела, процент идентичности последовательностей между областями представляющего интерес и эталонного антитела представляет собой количество положений, занятых одинаковыми аминокислотами, в областях как представляющего интерес, так и эталонного антитела, разделенное на общее количество выровненных положений двух областей, без подсчета разрывов, умноженное на 100 для преобразования в проценты.

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

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

Если обратное не является очевидным из контекста, термин "приблизительно" охватывает несущественные вариации, такие как значения в пределах стандартной погрешности (например, СОС - стандартной ошибки среднего) от установленной величины.

Статистическая значимость означает $p \leq 0,05$.

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

Подробное описание изобретения

I. Общая часть.

В настоящем изобретении предложены антитела, которые связываются с тау. Некоторые антитела специфично связываются с эпитопом в пределах остатков 55-78 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам 113-136 SEQ ID NO: 1), таким как, например, эпитоп в пределах остатков 60-75 (соответствуют остаткам 118-133 SEQ ID NO: 1) или в пределах остатков 61-70 (соответствуют остаткам 119-128 SEQ ID NO: 1). Некоторые такие антитела могут специфично связываться с двумя пептидами, например первым пептидом, содержащим остатки 55-69 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам 113-127 SEQ ID NO: 1), а также

вторым пептидом, содержащим остатки 64-78 (соответствуют остаткам 122-136 SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела связываются с тау вне зависимости от статуса фосфорилирования. Некоторые антитела согласно настоящему изобретению выступают для ингибирования или отсрочивания связанных с тау патологий и связанных ухудшений симптомов. Несмотря на то что для реализации настоящего изобретения на практике понимание механизма не является необходимым, снижение токсичности может возникнуть в результате индуцированного антителом фагоцитоза тау, ингибирования меж- или внутримолекулярной агрегации тау или связывания с другими молекулами посредством стабилизации нетоксичной конформации, посредством ингибирования межклеточной или внутриклеточной передачи патогенных форм тау, посредством блокады фосфорилирования тау, посредством предотвращения связывания тау с клетками или посредством индукции протеолитического расщепления тау, помимо других механизмов. Антитела согласно настоящему изобретению или средства, которые индуцируют такие антитела, можно применять в способах лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера и других заболеваний, связанных с тау.

II. Молекулы-мишени.

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

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

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

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

041230

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

P10636-6 (тау человека4R0N) (SEQ ID NO:3)

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEEAGI	GDTPSLEDEA
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKGQANA	TRIPAKTPPA
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
PKTPPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV	VRTPPKSPSS
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQII	NKKLDLSNVQ	SKCGSKDNIK
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
HVPGGGSVQI	VYKPVDSLKV	TSKCGSLGNI	HHKPGGGQVE	VKSEKLDKDR	RVQSKIGSLD
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
NITHVPGGGN	KKIETHKLTF	RENAKAKTDH	GAEIVYKSPV	VSGDTSRHL	SNVSSTGSID
<u>370</u>	<u>380</u>				
MVDSPQLATL	ADEVASLAK	QGL			

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGQAA	AQPHTIPEG	TTAEAGIGD	TPSLEDEAAG
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
TPPSSGEPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSR	RTPSLPTPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>

SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK CGSLGNIHHK
 310 320 330 340 350 360
 PGGGQVEVKS EKLDKDFKRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFRN AKAKTDHGAE
 370 380 390 400 410
 IVYKSPVVSG DTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

10 20 30 40 50 60
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 70 80 90 100 110 120
 SETSDAKSTP TAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT
 130 140 150 160 170 180
 KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
 190 200 210 220 230 240
 SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ
 250 260 270 280 290 300
 PGGGKVQIVY KPVDSLKVT SKGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDFKRV QSKIGSLDNI
 310 320 330 340 350 360
 THVPGGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
 370 380
 DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

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

Указание на тау включает известные природные вариации, приблизительно 30 из которых перечислены в базе данных Swiss-Prot, и их пермутации, а также мутации, связанные с патологиями тау, такими как деменция, болезнь Пика, надъядерный паралич и т.д. (см., например, базу данных Swiss-Prot и публикацию Poorkaj et al., Ann Neurol., 43:815-825 (1998)). Некоторые примеры мутаций тау, пронумерованных согласно изоформе 441, представляют собой мутацию лизина на треонин в остатке аминокислоты 257 (K257T), мутацию изолейцина на валин в положении аминокислоты 260 (I260V); мутацию глицина на валин в положении аминокислоты 272 (G272V); мутацию аспарагина на лизин в положении аминокислоты 279 (N279K); мутацию аспарагина на гистидин в положении аминокислоты 296 (N296H); мутацию пролина на серин в положении аминокислоты 301 (P301S); мутацию пролина на лейцин в положении аминокислоты 301 (P301L); мутацию глицина на валин в положении аминокислоты 303 (G303V); мута-

цию серина на аспарагин в положении 305 (S305N); мутацию глицина на серин в положении аминокислоты 335 (G335S); мутацию валина на метионин в положении 337 (V337M); мутацию глутаминовой кислоты на валин в положении 342 (E342V); мутацию лизина на изолейцин в положении аминокислоты 369 (K369I); мутацию глицина на аргинин в положении аминокислоты 389 (G389R); и мутацию аргинина на триптофан в положении аминокислоты 406 (R406W).

Тау может являться фосфорилированным по одному или нескольким остаткам аминокислот, включая тирозин в положениях аминокислоты 18, 29, 97, 310 и 394, серин в положениях аминокислоты 184, 185, 198, 199, 202, 208, 214, 235, 237, 238, 262, 293, 324, 356, 396, 400, 404, 409, 412, 413 и 422; и треонин в положениях аминокислоты 175, 181, 205, 212, 217, 231 и 403. Если из контекста не очевидно обратное, указание на тау или их фрагменты включает природные аминокислотные последовательности человека, включая их изоформы, мутанты и аллельные варианты.

IV. Антитела.

A. Специфичность связывания и функциональные свойства.

В настоящем изобретении предложены антитела, которые связываются с тау. Некоторые антитела специфично связываются с эпитопом в пределах остатков 55-78 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам 113-136 SEQ ID NO: 1), таким как, например, эпитоп в пределах остатков 60-75 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам 118-133 SEQ ID NO: 1) или в пределах остатков 61-70 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам 119-128 SEQ ID NO: 1). Некоторые антитела связываются с тау вне зависимости от статуса фосфорилирования. Данные антитела можно получить посредством иммунизации полипептидом тау, очищенным из природного источника или экспрессированным рекомбинантным способом. Можно провести скрининг антител в отношении связывания с тау в нефосфорилированной форме, а также в форме, в которой один или несколько остатков, поддающихся фосфорилированию, являются фосфорилированными. Такие антитела предпочтительно связываются с неотличимыми аффинностями или по меньшей мере в пределах 1,5-, 2- или 3-кратной величины аффинности с фосфорилированным тау по сравнению с нефосфорилированным тау (т.е. являются "панспецифичными"). 16G7 представляет собой пример панспецифичного моноклонального антитела. В настоящем изобретении также предложены антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и любое из вышеупомянутых антител, таким как, например, эпитоп 16G7. Также включены антитела, конкурирующие за связывание с тау с любым из вышеупомянутых антител, такие как, например, конкурирующие с 16G7.

Вышеупомянутые антитела можно получить *de novo* посредством иммунизации пептидом, содержащим остатки 55-78, 55-69 или 64-78 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам 113-136, 113-127 или 122-136, соответственно, SEQ ID NO: 1), или посредством иммунизации полноразмерным полипептидом тау или его фрагментом, содержащим такие остатки, и проведения скрининга в отношении специфичного связывания с пептидом, содержащим такие остатки. Такие пептиды предпочтительно присоединены к гетерологичной конъюгированной молекуле, которая способствует вызову ответа в форме антител на пептид. Присоединение может являться прямым или опосредованным спейсерным пептидом или аминокислотой. Цистеин используют в качестве спейсерной аминокислоты, поскольку его свободная SH-группа облегчает присоединение молекулы-носителя. Также можно применять полиглициновый линкер (например, 2-6 глицинов) с остатком цистеина между глицинами и пептидом или без такого остатка. Молекула-носитель выступает для обеспечения Т-клеточного эпитопа, который способствует вызову ответа в форме антител на пептид. Обычно используют некоторые носители, в частности гемоцианин фисуреллы (keyhole limpet hemocyanin, KLH), овальбумин и бычий сывороточный альбумин (БСА). К пептидному иммуногену в процессе твердофазного пептидного синтеза можно добавить пептидные спейсеры. Носители, как правило, добавляют посредством химического перекрестного сшивания. Некоторые примеры химических перекрестно-сшивающих веществ, которые можно применять, включают сложный эфир кросс-N-малеимида-6-аминокапроила или сложный эфир т-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид (MBS) (см., например, публикации Harlow, E. et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988; Sinigaglia et al., *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz et al., *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer et al., *Cell*, 74:197-203 (1993); Falk, K. et al., *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; и Southwood et al., *J. Immunology*, 160:3363-3373 (1998)). Носитель и спейсер в случае наличия могут быть присоединены к любому концу иммуногена.

Пептид с необязательным спейсером и носителем можно применять для иммунизации лабораторных животных или В-клеток, как описано более подробно ниже. Можно исследовать способность супернатантов гибридомы связываться с одним или несколькими пептидами, содержащими остатки 55-78, 55-69 или 64-78 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам 113-136, 113-127 или 122-136, соответственно, SEQ ID NO: 1), и/или с фосфорилированной и нефосфорилированной формами тау, такими как, например, полноразмерная изоформа тау с положением 404 в фосфорилированной форме. Пептид может быть присоединен к носителю или другой метке для облегчения скринингового анализа. В данном случае носитель или метка предпочтительно отличны от комбинации молекулы спейсера и носителя, которые применяли для иммунизации, для устранения антител, специфичных в отношении спейсера или носителя вместо пептида тау. Можно применять любую из изоформ тау.

В настоящем изобретении предложены моноклональные антитела, связывающиеся с эпитопами в

пределах тау. Антитело, обозначенное 16G7, представляет собой одно такое иллюстративное антитело мыши. Если из контекста не очевидно обратное, упоминание о 16G7 следует понимать как упоминание о любой из формы мыши, химерной, венированной и гуманизированной формы данного антитела. Антитело было депонировано как [НОМЕР ДЕПОНИРОВАНИЯ]. Данное антитело специфично связывается в пределах остатков аминокислот 55-78, 55-69 или 64-78 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам 113-136, 113-127 или 122-136, соответственно, SEQ ID NO: 1). Данное антитело также характеризуется способностью связываться как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным тау, как с непатологической, так и с патологической формами и конформациями тау, и с неправильно свернутыми/агрегированными формами тау.

Некоторые антитела согласно настоящему изобретению связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и антитело, обозначенное 16G7. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей данного антитела обозначены SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11 соответственно. Другие антитела, характеризующиеся такой специфичностью связывания, можно получить посредством иммунизации мышей тау или его частью, содержащей желаемый эпитоп, и проведения скрининга полученных в результате антител в отношении связывания с тау, необязательно в конкуренции с антителом, содержащим переменные области 16G7 мыши (IgG1 каппа). Фрагменты тау, содержащие желаемый эпитоп, могут быть присоединены к носителю, который способствует вызову ответа в форме антител на фрагмент, и/или могут быть объединены с адъювантом, который способствует вызову такого ответа. Можно провести скрининг таких антител в отношении отличающегося связывания с тау или его фрагментом по сравнению с мутантами указанных остатков. Скрининг по сравнению с такими мутантами более точно определяет специфичность связывания, чтобы обеспечить идентификацию антител, связывание которых ингибируется посредством мутагенеза конкретных остатков и которые, вероятно, характеризуются одинаковыми функциональными свойствами с другими иллюстративными антителами. Мутации могут представлять собой систематическую замену замещением аланином (или серином, если аланин уже присутствует) одного остатка за один раз или в течение более длительных интервалов времени, на всем протяжении мишени или на всем протяжении ее части, в которой, как известно, располагается эпитоп. Если один и тот же набор мутаций в значительной степени снижает связывание двух антител, два антитела связываются с одним эпитопом.

Антитела, которые характеризуются специфичностью связывания выбранного антитела мыши (например, 16G7), можно также получить с применением варианта способа фагового дисплея. См. публикацию Winter, WO 92/20791. Данный способ, в частности, подходит для получения антител человека. В данном способе переменную область тяжелой или легкой цепи выбранного антитела мыши используют в качестве исходного материала. Если, например, в качестве исходного материала выбирают переменную область легкой цепи конструируют фаговую библиотеку, в которой члены экспонируют одну и ту же переменную область легкой цепи (т.е. исходный материал мыши) и различные переменные области тяжелой цепи. Переменные области тяжелой цепи можно, например, получить из библиотеки реаранжированных переменных областей тяжелых цепей человека. Выбирают фаг, демонстрирующий мощное специфичное связывание с тау или его фрагментом (например, по меньшей мере 10^9 M⁻¹). Затем переменные области тяжелой цепи из данного фага используют в качестве исходного материала для конструирования следующей фаговой библиотеки. В данной библиотеке каждый фаг экспонирует одну и ту же переменную область тяжелой цепи (т.е. область, идентифицированную из первой библиотеки дисплея) и различные переменные области легкой цепи. Переменные области легкой цепи можно получить, например, из библиотеки реаранжированных переменных областей легкой цепи человека. Вновь выбирают фаг, демонстрирующий мощное специфичное связывание с тау. Полученные в результате антитела обычно характеризуются одинаковой или аналогичной эпитопной специфичностью, что и исходный материал мыши.

CDR тяжелой цепи 16G7 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа обозначены SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, и CDR легкой цепи 16G7 согласно Кэботу обозначены SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно.

Таблица 2

CDR 16G7 согласно определению Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота, AbM и контактному определению

Петля	Кэбот	Чотиа	Сводное определение Чотиа и Кэбота	AbM	Контактное определение
L1	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L30--L36 SEQ ID NO: 43
L2	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L46--L55 SEQ ID NO: 44
L3	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L97 SEQ ID NO:14v	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L96 SEQ ID NO:45
H1	H31--H35B SEQ ID NO:39	H26--H32 SEQ ID NO:40	H26--H35B SEQ ID NO:8	H26--H35B SEQ ID NO:8	H30--H35B SEQ ID NO:46
H2	H50--H65 SEQ ID NO: 9	H52--H56 SEQ ID NO:41	H50--H65 SEQ ID NO: 9	H50--H58 SEQ ID NO:42	H47--H58 SEQ ID NO:47
H3	H95--H102 SEQ ID NO: 10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO: 10	H95--H102 SEQ ID NO: 10	H93--H101 SEQ ID NO:48

Другие антитела можно получить посредством мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи иллюстративного антитела, такого как 16G7. Моноклональные антитела, которые по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны 16G7 по аминокислотной последовательности зрелых вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепей и сохраняют их функциональные свойства и/или которые отличаются от соответствующего антитела небольшим количеством функционально несущественных замен аминокислот (например, консервативных замен), делеций или вставок, также включены в настоящее изобретение. Также включены моноклональные антитела, содержащие по меньшей мере один или все шесть CDR согласно любому общепринятому определению, но предпочтительно согласно Кэботу, которые на 90, 95, 99 или 100% идентичны соответствующим CDR 16G7.

В настоящем изобретении также предложены антитела, содержащие некоторые или все (например, 3, 4, 5 и 6) CDR, полученные полностью или по существу из 16G7. Такие антитела могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит по меньшей мере два, но обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из вариабельной области тяжелой цепи 16G7, и/или вариабельную область легкой цепи, которая содержит по меньшей мере два, но обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из вариабельной области легкой цепи 16G7. Антитела могут содержать как тяжелую, так и легкую цепи. CDR по существу получен из соответствующего CDR 16G7, когда он содержит не более 4, 3, 2 или 1 замен, вставок или делеций за исключением того, что CDR-H2 (при определении согласно Кэботу) может содержать не более 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен, вставок или делеций. Такие антитела могут характеризоваться идентичностью по меньшей мере 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% с 16G7 аминокислотной последовательности зрелых вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепей и сохранять их функциональные свойства и/или могут отличаться от 16G7 небольшим количеством функционально несущественных замен аминокислот (например, консервативных замен), делеций или вставок.

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

В. Антитела, отличные от антител человека.

Получение других антител, отличных от антител человека, например мыши, морской свинки, примата, кролика или крысы, против тау или его фрагмента (например, остатков аминокислот 55-78, 60-75, 61-70, 55-69 или 64-78 SEQ ID NO: 3, соответствующих остаткам аминокислот 113-136, 118-133, 119-128, 113-127 или 122-136, соответственно, SEQ ID NO: 1) можно осуществить посредством, например, иммунизации животного тау или его фрагментом. См. руководство Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988) (включено посредством ссылки для всех целей). Такой иммуноген можно получить из природного источника посредством пептидного синтеза или посредством рекомбинантной экспрессии. Необязательно иммуноген можно вводить слитым с белком-носителем или в иным способом

образованном комплексе с белком-носителем. Необязательно иммуноген можно вводить с адъювантом. Можно применять несколько типов адъювантов, как описано ниже. Для иммунизации лабораторных животных предпочтительным является полный адъювант Фрейнда с последующим использованием неполного адъюванта. Для получения поликлональных антител, как правило, применяют кроликов или морских свинок. Для получения моноклональных антител, как правило, применяют мышей. Проводят скрининг антител в отношении специфичного связывания с тау или с эпитопом в пределах тау (например, эпитопом, содержащим один или несколько из остатков аминокислот 55-78, 60-75 или 61-70 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 113-136, 118-133 или 119-128, соответственно, SEQ ID NO: 1). Такой скрининг можно осуществить посредством определения связывания антитела с совокупностью вариантов тау, таких как варианты тау, содержащие остатки аминокислот 55-78, 60-75, 61-70, 55-69 или 64-78 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 113-136, 118-133, 119-128, 113-127 или 122-136, соответственно, SEQ ID NO: 1), или мутации в пределах данных остатков, и определения того, какие варианты тау связываются с антителом. Связывание можно оценить, например, методом вестернблоттинга, FACS или ELISA.

С. Гуманизированные антитела.

Гуманизированное антитело представляет собой генноинженерное антитело, в котором CDR от "донорного" антитела, отличного от антитела человека, переносят в "акцепторные" последовательности антитела человека (см., например, публикации Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US 6407213; Adair, US 5859205; и Foote, US 6881557). Последовательности акцепторного антитела могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, объединение таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антитела человека или последовательность зародышевой области. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, содержащее по меньшей мере три, четыре, пять или все CDR, полученные полностью или по существу из донорного антитела, и последовательности каркасного участка вариабельной области и константные области, в случае присутствия полученные полностью или по существу из последовательностей антитела человека. Аналогично гуманизированная тяжелая цепь содержит по меньшей мере один, два и обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из тяжелой цепи донорного антитела, и последовательность каркасного участка вариабельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, в случае присутствия полученные по существу из последовательностей каркасного участка вариабельной области и константной области тяжелой цепи человека. Аналогично гуманизированная легкая цепь содержит по меньшей мере один, два и обычно все три CDR, полученные полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела, и последовательность каркасного участка вариабельной области легкой цепи и константную область легкой цепи, в случае присутствия полученные по существу из последовательностей каркасного участка вариабельной области и константной области легкой цепи человека. В отличие от нанотел и dAb гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе получены по существу из соответствующего CDR в антителе, отличном от антитела человека, когда по меньшей мере 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков (согласно любому общепринятому определению, но предпочтительно определенных согласно Кэботу) являются идентичными между соответствующими CDR. Последовательности каркасного участка вариабельной области цепи антитела или константная область цепи антитела получены по существу из последовательности каркасного участка вариабельной области человека или константной области человека соответственно, когда по меньшей мере 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков, определенных согласно Кэботу, являются идентичными. Для классификации в качестве гуманизированного в соответствии с определением гуманизированных антител согласно международным непатентованным наименованиям (МНН) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) от 2014 г. антитело должно характеризоваться идентичностью по меньшей мере 85% с последовательностями антитела зародышевой линии человека (т.е. до соматической гипермутации). Смешанные антитела представляют собой антитела, в которых одна цепь антитела (например, тяжелая цепь) соответствует предельному значению, но другая цепь (например, легкая цепь) не соответствует предельному значению. Антитело классифицируют как химерное, если ни одна из цепей не соответствует предельному значению, даже если каркасные участки вариабельной области для обеих цепей были получены по существу от человека с некоторыми обратными мутациями мыши. См. публикацию Jones et al. (2016), The INNs and outs of antibody nonproprietary names, mAbs 8:1, 1-9, DOI: 10.1080/19420862.2015.1114320. См. также публикацию "WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)" (интернет) 2014. Доступна по адресу: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>, включена в настоящий документ посредством ссылки. Во избежание сомнений термин гуманизированное в настоящем документе не ограничен определением гуманизированных антител согласно МНН ВОЗ 2014 г. Некоторые из гуманизированных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности по меньшей мере 85% последовательностям зародышевой линии человека, и некоторые из гуманизированных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности менее 85% последовательностям зародышевой линии человека. Некоторые из тяжелых цепей гуманизированных антител, предложенных в настоящем документе, характе-

ризуются идентичностью последовательности от приблизительно 60 до 100% с последовательностями зародышевой линии человека, такие как, например, в диапазоне от приблизительно 60 до 69%, от 70 до 79%, от 80 до 84% или от 85% до 89%. Некоторые тяжелые цепи не достигают до определения согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются, например, идентичностью последовательности приблизительно 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 или 84% с последовательностями зародышевой линии человека, тогда как другие тяжелые цепи соответствуют определению согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются приблизительно 85, 86, 87, 88, 89% или большей идентичностью последовательности с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые из легких цепей гуманизированных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности от приблизительно 60 до 100% с последовательностями зародышевой линии человека, такими как, например, в диапазоне от приблизительно 80 до 84% или от 85 до 89%. Некоторые легкие цепи не достигают до определения согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются, например, идентичностью последовательности приблизительно 81, 82, 83 или 84% с последовательностями зародышевой линии человека, тогда как другие легкие цепи соответствуют определению согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются приблизительно 85, 86, 87, 88, 89% или большей идентичностью последовательности с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в настоящем документе, которые являются "химерными" в соответствии с определением согласно МНН ВОЗ 2014 г., содержат тяжелые цепи с идентичностью менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренные с легкими цепями, которые характеризуются идентичностью менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в настоящем документе, являются "смешанными" в соответствии с определением согласно МНН ВОЗ 2014 г., например, содержат тяжелую цепь с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренную с легкой цепью, которая характеризуется идентичностью последовательности менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека или наоборот. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в настоящем документе, соответствуют определению "гуманизированного" антитела согласно МНН ВОЗ 2014 г. и содержат тяжелую цепь с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренную с легкой цепью, которая характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека. Иллюстративные антитела, которые соответствуют определению "гуманизированных" антител согласно МНН ВОЗ 2014 г., включают антитела, содержащие зрелую легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29, спаренную со зрелой тяжелой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27. Дополнительные гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению включают антитела, содержащие зрелую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 15-27, спаренную со зрелой легкой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 28-30.

Несмотря на то что гуманизированные антитела часто содержат все шесть CDR (определенных согласно любому общепринятому определению, но предпочтительно согласно определению Кэбота) из антитела мыши, их также можно получить не со всеми CDR (например, по меньшей мере с 3, 4 или 5 CDR) из антитела мыши (например, Pascalis et al., *J. Immunol.*, 169:3076, 2002; Vajdos et al., *J. of Mol. Biol.*, 320:415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.*, 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *J. Immunol.*, 164:1432-1441, 2000).

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

Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замещения также можно выбрать эмпирически.

Последовательности акцепторного антитела человека можно необязательно выбрать среди множества известных последовательностей антитела человека для получения высокой степени идентичности

последовательности (например, идентичности 65-85%) между каркасными участками вариабельной области акцепторной последовательности человека и соответствующими каркасными участками вариабельной области цепи донорного антитела.

Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи представляет собой зрелую вариабельную область тяжелой цепи человека с учетным кодом NCBI AAA18265.1 (SEQ ID NO: 31). Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи представляет собой зрелую вариабельную область тяжелой цепи человека с учетным кодом NCBI ADW08092.1 (SEQ ID NO: 32). Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи представляет собой зрелую вариабельную область тяжелой цепи человека с учетным кодом NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 33). IMGT# IGHV1-2*02 содержит CDR-H1 и CDR-H2, которые характеризуются такой же канонической формой, что и тяжелая цепь 16G7 мыши, и является членом подгруппы 1 тяжелой цепи человека согласно Кэботу. Пример акцепторной последовательности для легкой цепи представляет собой зрелую вариабельную область легкой цепи человека с учетным кодом NCBI AAB24404.1 (SEQ ID NO: 34). Пример акцепторной последовательности для легкой цепи представляет собой зрелую вариабельную область легкой цепи человека с учетным кодом NCBI AEK69364.1 (SEQ ID NO: 35). Пример акцепторной последовательности для легкой цепи представляет собой зрелую вариабельную область легкой цепи человека с учетным кодом NCBI IMGT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 36). IMGT#IGKV4-1*01 характеризуется теми же каноническими классами для CDR-L1, CDR-L2 и L3, что и 16G7 мыши, и принадлежит к подгруппе 1 каппа человека.

Если выбирают более одной акцепторной последовательности антитела человека, можно применять объединение или гибрид данных акцепторов, и аминокислоты, используемые в различных положениях в гуманизированных вариабельных областях легкой цепи и тяжелой цепи, могут быть взяты из любой из используемых последовательностей акцепторного антитела человека.

Определенные аминокислоты из каркасных остатков вариабельной области человека можно выбрать для замещения на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных влияний осуществляют посредством моделирования, изучения характеристик аминокислот в конкретных расположениях или эмпирического наблюдения за эффектами замены или мутагенеза конкретных аминокислот.

Например, когда аминокислота отличается между каркасным остатком вариабельной области мыши и выбранным каркасным остатком вариабельной области человека, каркасную аминокислоту человека можно заменить эквивалентной каркасной аминокислотой из антитела мыши, когда обоснованно ожидают, что аминокислота

- (1) нековалентно напрямую связывается с антигеном;
- (2) прилегает к участку CDR или в пределах CDR согласно определению Чотиа, но не Кэбота;
- (3) иным способом взаимодействует с участком CDR (например, находится в пределах приблизительно 6 Å от участка CDR) (например, что идентифицировано посредством моделирования легкой или тяжелой цепи на расшифрованной структуре гомологичной известной цепи иммуноглобулина); или
- (4) представляет собой остаток, участвующий в поверхности взаимодействия VL-VH.

В настоящем изобретении предложены гуманизированные формы антитела 16G7 мыши, включая 13 иллюстративных гуманизированных зрелых вариабельных областей тяжелой цепи:

hu16G7VHv1 (SEQ ID NO:15), hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16),
 hu16G7VHv2a (SEQ ID NO:17), 16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18), hu16G7VHv2b (SEQ ID NO:19), hu16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO:20), hu16G7VHv3 (SEQ ID NO:21), hu16G7VHv4 (SEQ ID NO:22), hu16G7VHv5V (SEQ ID NO:23), hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24),
 hu16G7VHv6a (SEQ ID NO:25), hu16G7VHv6b (SEQ ID NO:26) hu16G7VHv7 (SEQ ID NO:27),

и 3 иллюстративные гуманизированные зрелые вариабельные области легкой цепи:

hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28), hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29) и hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30).

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

Каркасные остатки из классов с (1) по (3) согласно определению Queen, US 5530101 иногда в качестве альтернативы называют каноническими и верньерными остатками. Каркасные остатки, которые помогают определить конформацию петли CDR, иногда называют каноническими остатками (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Thornton & Martin, J. Mol. Biol., 263:800-815 (1996)). Каркасные остатки, которые поддерживают конформацию антигенсвязывающей петли и играют роль в тонкой настройке соответствия антитела антигену, иногда называют верньерными остатками (Foote & Winter, J. Mol. Biol., 224:487-499 (1992)).

Другие каркасные остатки, которые являются кандидатами для замены, представляют собой остатки, образующие потенциальный сайт гликозилирования. Еще одними кандидатами для замены являются

акцепторные каркасные аминокислоты человека, которые являются необычными для иммуноглобулина человека в данном положении. Данные аминокислоты можно заменить аминокислотами из эквивалентного положения донорного антитела мыши или из эквивалентного положения более типичных иммуноглобулинов человека.

Другие каркасные остатки, которые являются кандидатами для замены, представляют собой N-концевые остатки глутамина (Q), которые можно заменить глутаминовой кислотой (E) для минимизации возможности конверсии пироглутамата [Y. Diana Liu et al., 2011, J. Biol. Chem., 286:11211-11217]. Конверсия глутаминовой кислоты (E) в пироглутамат (pE) происходит более медленно, чем глутамина (Q). В связи с утратой первичного амина при конверсии глутамина в pE антитела становятся более кислыми. В результате неполной конверсии в антителе возникает гетерогенность, которую можно наблюдать в виде множества пиков с применением аналитических способов на основе заряда. Различия в гетерогенности могут свидетельствовать о недостаточном контроле процесса. Иллюстративные гуманизированные антитела с N-концевыми заменами глутамина на глутамат представляют собой

SEQ ID NO:15 (hu16G7VHv1), SEQ ID NO:16

(hu16G7VHv2), SEQ ID NO:17 (hu16G7VHv2a), SEQ ID NO:18 (16G7VHv2aB7), SEQ ID

NO:19 (hu16G7VHv2b), SEQ ID NO:20 (hu16G7VHv2bH7), SEQ ID NO:21 (hu16G7VHv3),

SEQ ID NO:22 (hu16G7VHv4), SEQ ID NO:23 (hu16G7VHv5V), SEQ ID NO:24

(hu16G7VHv5VR) и SEQ ID NO:27 (hu16G7VHv7).

Иллюстративные гуманизированные антитела представляют собой гуманизированные формы 16G7 мыши, обозначенные Hu16G7.

Антитело 16G7 мыши содержит зрелые переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые содержат SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11 соответственно. В настоящем изобретении предложены 13 иллюстративных гуманизированных зрелых переменных областей тяжелой цепи:

hu16G7VHv1, hu16G7VHv2, hu16G7VHv2a, 16G7VHv2aB7, hu16G7VHv2b,

hu16G7VHv2bH7, hu16G7VHv3, hu16G7VHv4, hu16G7VHv5V, hu16G7VHv5VR,

hu16G7VHv6a, hu16G7VHv6b и hu16G7VHv7.

В настоящем изобретении также предложены 3 иллюстративные зрелые переменные области легкой цепи человека: hu16G7VLv1, hu16G7VLv2 и hu16G7VLv3. На фиг. 2 и 3 представлены выравнивания переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи соответственно, 16G7 мыши и различных гуманизированных антител.

По причинам, таким как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, представление собой сайта для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, представление собой необычного остатка для своего положения в последовательности переменной области человека и вследствие этого потенциально иммуногенного, приобретение потенциала агрегации, и по другим причинам следующие 33 каркасных положений переменной области посчитали кандидатами для замены в 3 иллюстративных зрелых переменных областях легкой цепи человека и 13 иллюстративных зрелых переменных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примерах:

L4 (M4L), L9 (D9S), L15 (L15V), L18

(R18K), L19 (A19V), L21 (I21M), L22 (N22S), L43 (P43S), L48 (I48M), H1 (Q1E), H5 (V5Q),

H7 (S7P), H9 (A9S), H10 (E10V), H11 (V11L), H12 (K12V), H13 (K13R), H20 (V20L), H37

(V37A), H38 (R38K), H40 (A40R), H48 (M48I), H66 (R66K), H67 (V67K), H69 (M69L), H71

(R71V), H73 (T73I), H75 (I75S или I75A), H80 (M80V), H82a (S82a-T), H82b (R82b-S), H83

(R83T), H85 (D85E).

Следующие 3 положения CDR переменной области посчитали кандидатами для замены в 13 иллюстративных зрелых переменных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примерах: H31 (S31G), H60 (N60A) и H64 (K64Q).

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

Иллюстративные антитела включают любые пермутации или комбинации иллюстративных зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей, например,

VHv1/VLv1, VHv1/VLv2, VHv1/VLv3, VHv2/VLv1, VHv2/VLv2, VHv2/VLv3, VHv2a/VLv1, VHv2a/VLv2, VHv2a/VLv3, VHv2aB7/VLv1, VHv2aB7/VLv2, VHv2aB7/VLv3, VHv2b/VLv1, VHv2b/VLv2, VHv2b/VLv3, VHv2bH7/VLv1, VHv2bH7/VLv2, VHv2bH7/VLv3, VHv3/VLv1, VHv3/VLv2, VHv3/VLv3, VHv4/VLv1, VHv4/VLv2, VHv4/VLv3, VHv5/VLv1, VHv5/VLv2, VHv5/VLv3, VHv5VR/VLv1, VHv5VR/VLv2, VHv5VR/VLv3, VHv6a/VLv1, VHv6a/VLv2, VHv6a/VLv3, VHv6b/VLv1, VHv6b/VLv2, VHv6b/VLv3, VHv7/VLv1, VHv7/VLv2 или VHv7/VLv3.

В настоящем изобретении предложены варианты гуманизированного антитела 16G7, в которых гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с

hu16G7VHv1, hu16G7VHv2, hu16G7VHv2a, 16G7VHv2aB7, hu16G7VHv2b, hu16G7VHv2bH7, hu16G7VHv3, hu16G7VHv4, hu16G7VHv5V, hu16G7VHv5VR, hu16G7VHv6a, hu16G7VHv6b и hu16G7VHv7 (SEQ ID NO: 15-27),

и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с hu16G7VLv1, hu16G7VLv2 и hu16G7VLv3 (SEQ ID NO: 28-30). В некоторых таких антителах сохраняется по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или все 36 из обратных мутаций или других мутаций, обнаруженных в SEQ ID NO: 15-27 и SEQ ID NO: 28-30.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H5 занимает Q, H7 занимает P, H9 занимает S, H10 занимает V, H11 занимает L, H12 занимает V, H13 занимает R, H20 занимает L, H40 занимает R, H48 занимает I, H66 занимает K, H67 занимает A, H69 занимает L, H71 занимает V, H73 занимает I, H75 занимает S, H80 занимает V, H82a занимает T, H82b занимает S, H83 занимает T, и H85 занимает E. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают E, Q, P, S, V, L, V, R, L, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T и E соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H5 занимает Q, H7 занимает P, H9 занимает S, H10 занимает V, H11 занимает L, H12 занимает V, H13 занимает R, H20 занимает L, H48 занимает I, H69 занимает L, H71 занимает V, H82a занимает T, H82b занимает S, H83 занимает T, и H85 занимает E. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H48, H69, H71, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают E, Q, P, S, V, L, V, R, L, I, L, V, T, S, T и E соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H5 занимает Q, H11 занимает L, H12 занимает V, H20 занимает L, H48 занимает I, H69 занимает L, H71 занимает V, H82a занимает T, H82b занимает S, H83 занимает T, и H85 занимает E. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H5, H11, H12, H20, H48, H69, H71, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают E, Q, L, V, L, I, L, V, T, S, T и E соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H12 занимает V, H31 занимает G, H40 занимает R, H48 занимает I, H60 занимает A, H69 занимает L, H73 занимает I, и H83 занимает T. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H12, H31, H40, H48, H60, H69, H73 и H83 в области VH занимают E, V, G, R, I, A, L, I и T соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H12 занимает V, H40 занимает R, H48 занимает I, H69 занимает L, H73 занимает I, и H83 занимает T. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H12, H40, H48, H69, H73 и H83 в области VH занимают E, V, R, I, L, I и T соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H12 занимает V, H40 занимает R, H48 занимает I, H66 занимает K, H67 занимает A, H69 занимает L, H71 занимает V, H73 занимает I, и H83 занимает T. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H12, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73 и H83 в области VH занимают E, V, R, I, K, A, L, V, I и T соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает E, H12 занимает V, H40 занимает R, H48 занимает I, H69 занимает L, H73 занимает I, и H83 занимает T. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H12, H40, H48, H69, H73 и H83 в области VH занимают E, V, R, I, L, I и T соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H7 занимает P, H71 занимает V, и H73 занимает I. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H7, H71 и H73 в области VH занимают P, V и I соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H31 занимает G, и H60 занимает A. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H31 и H60 в области VH занимают G и A соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H12, H31, H40, H48, H60, H66, H67, H69, H71, H73 и H83 в области VH занимают Q, V, G, R, I, A, K, A, L, V, I и T соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H7, H71 и H73 в области VH занимают Q, P, V и I соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H1 занимает Q или E, H5 занимает V или Q, H7 занимает S или P, H9 занимает A или S, H10 занимает E или V, H11 занимает V или L, H12 занимает K или V, H13 занимает K или R, H20 занимает V или L, H31 занимает G или S, H37 занимает V или A, H38 занимает R или K, H40 занимает A или R, H48 занимает M или I, H60 занимает A или N, H64 занимает Q или K, H66 занимает R или K, H67 занимает V или A, H69 занимает M или L, H71 занимает R или V, H73 занимает T или I, H75 занимает I, S, или A, H80 занимает M или V, H82a занимает S или T, H82b занимает R или S, H83 занимает R или T, и H85 занимает D или E.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H37, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают E, Q, P, S, V, L, V, R, L, A, K, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T и E соответственно, как в hu16G7VHv1. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H5, H11, H12, H20, H48, H69, H71, H75, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают E, Q, L, V, L, I, L, V, A, T, S, T и E соответственно, как в hu16G7VHv2. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H12, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73 и H83 в области VH занимают E, V, R, I, K, A, L, V, I и T соответственно, как в hu16G7VHv2a. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H12, H31, H40, H48, H60, H66, H67, H69, H71, H73 и H83 в области VH занимают E, V, G, R, I, A, K, A, L, V, I и T соответственно, как в hu16G7VHv2aB7. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H12, H40, H48, H69, H73 и H83 в области VH занимают E, V, R, I, L, I и T соответственно, как в hu16G7VHv2b. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H12, H31, H40, H48, H60, H64, H69, H73 и H83 в области VH занимают E, V, G, R, I, A, Q, L, I и T соответственно, как в hu16G7VHv2bH7. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H48, H69, H71, H75, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают E, Q, P, S, V, L, V, R, L, I, L, V, A, T, S, T и E соответственно, как в hu16G7VHv3. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H5, H11, H12, H20, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают E, Q, L, V, L, I, K, A, L, V, I, S, T, S, T и E соответственно, как в hu16G7VHv4. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают E, Q, P, S, V, L, V, R, L, K, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T и E соответственно, как в hu16G7VHv5V. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83 и H85 в области VH занимают Q, P, S, V, L, V, R, L, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T и E соответственно, как в hu16G7VHv5VR. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H7, H71 и H73 в области VH занимают P, V и I соответственно, как в hu16G7VHv6a. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положение H71 в области VH занимает V, как в hu16G7VHv6b. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения H1, H7, H71 и H73 в области VH занимают E, P, V и I соответственно, как в hu16G7VHv7.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 вариабельная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 вариабельная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 каждая из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 8, 9 и 10), и три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 12, 13 и 14); при условии, что положение H31 занимает S или G, положение H60 занимает N или A и положение 64 занимает K или Q. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 49. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 50. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, содержащую

SEQ ID NO: 51.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: L4 занимает L, L9 занимает S, L15 занимает V, L22 занимает S, и L43 занимает S. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения L4, L9, L15, L22 и L43 в области VL занимают L, S, V, S и S соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: L4 занимает L, L9 занимает S, L15 занимает V, L18 занимает K, L19 занимает V, L21 занимает M, L22 занимает S, и L43 занимает S. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22 и L43 в области VL занимают L, S, V, K, V, M, S и S соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 по меньшей мере одно из следующих положений в области VL занимает аминокислота, как указано: L4 занимает M или L, L9 занимает D или S, L15 занимает L или V, L18 занимает R или K, L19 занимает A или V, L21 занимает I или M, L22 занимает N или S, L43 занимает P или S, и L48 занимает I или M.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22 и L43 в области VL занимают L, S, V, K, V, M, S и S, соответственно, как в hu16G7VLv1. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения L4, L9, L15, L22 и L43 в области VL занимают L, S, V, S и S соответственно, как в hu16G7VLv2. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 положения L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22 и L43 в области VL занимают L, S, V, K, V, M, S и S соответственно, как в hu16G7VLv3.

В некоторых гуманизированных антителах 16G7 вариабельная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 вариабельная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности человека $\geq 85\%$. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 каждая из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 8, 9 и 10), и три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 12, 13 и 14); при условии, что положение H31 занимает S или G, положение H60 занимает N или A, и положение 64 занимает K или Q. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 49. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 50. В некоторых гуманизированных антителах 16G7 CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 51.

Участки CDR таких гуманизированных антител могут являться идентичными или по существу идентичными участкам CDR 16G7. Участки CDR можно определить согласно любому общепринятому определению (например, Чотиа или сводному определению Чотиа и Кэбота), но предпочтительно они определены согласно определению Кэбота.

Каркасные положения вариабельных областей соответствуют нумерации Кэбота, если не указано обратное. Другие такие варианты, как правило, отличаются от последовательностей иллюстративных тяжелой и легкой цепей Hu16G7 небольшим количеством (например, как правило, не более 1, 2, 3, 5, 10 или 15) замещений, делеций или вставок. Такие различия обычно присутствуют в каркасном участке, но могут также возникать в CDR.

Возможность дополнительной вариации в гуманизированных вариантах 16G7 заключается в дополнительных обратных мутациях в каркасных участках вариабельной области. Множество каркасных остатков, которые не осуществляют контакт с CDR в гуманизированном МАТ (моноклональном антителе), могут содержать замены аминокислот из соответствующих положений донорного МАТ мыши или других антител мыши или человека, и даже многие потенциальные осуществляющие контакт с CDR остатки также поддаются замене. Даже аминокислоты в пределах CDR можно заменить, например, остатками, обнаруженными в соответствующем положении акцепторной последовательности человека, использованной для обеспечения каркасных участков вариабельной области. Помимо этого можно применять альтернативные акцепторные последовательности человека, например, для тяжелой и/или легкой цепей. Если применяют различные акцепторные последовательности, одну или несколько из обратных мутаций, рекомендованных выше, можно не осуществлять, поскольку соответствующие донорные и акцепторные остатки уже являются одинаковыми без обратных мутаций.

Предпочтительно замены или обратные мутации в гуманизированных вариантах 16G7 (будь то консервативные или нет) не оказывают существенного эффекта в отношении аффинности связывания или активности гуманизированного МАТ, т.е. в отношении его способности связываться с тау.

Гуманизированные антитела 16G7 дополнительно характеризуются способностью связываться как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным тау и неправильно свернутыми/агрегированными формами тау.

D. Химерные и венированные антитела.

В настоящем изобретении также предложены химерная и венированная формы антител, отличных от антител человека, в частности антител 16G7 согласно примерам.

Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые переменные области легкой и тяжелой цепей антитела, отличного от антитела человека (например, мыши), объединены с константными областями легкой и тяжелой цепей человека. Такие антитела по существу или полностью сохраняют специфичность связывания антитела мыши и состоят приблизительно на две трети из последовательности человека. Согласно варианту реализации химерное антитело 16G7 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 54 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 55.

Венированное антитело представляет собой тип гуманизированного антитела, который сохраняет некоторые и обычно все из CDR и некоторые из каркасных остатков переменной области, отличных от остатков человека, антитела, отличного от антитела человека, но в котором другие каркасные остатки переменной области, которые могут вносить вклад в В- или Т-клеточные эпитопы, например экспонированные остатки (Padlan, *Mol. Immunol.*, 28:489, 1991), заменены остатками из соответствующих положений последовательности антитела человека. Результатом является антитело, в котором CDR получен полностью или по существу из антитела, отличного от антитела человека, и каркасные участки переменной области антитела, отличного от антитела человека, являются более подобными человеку благодаря заменам. Венированные формы антитела 16G7 включены в настоящее изобретение.

E. Антитела человека.

Антитела человека против тау или его фрагмента (например, остатков аминокислот 55-78, 60-75, 61-70, 55-69 или 64-78 SEQ ID NO: 3, соответствующих остаткам аминокислот 113-136, 118-133, 119-128, 113-127 или 122-136, соответственно, SEQ ID NO: 1) предложены посредством множества методов, описанных ниже. Некоторые антитела человека отобраны посредством конкурентных анализов связывания, посредством способа фагового дисплея согласно Winter, см. выше, или иным способом, чтобы данные антитела характеризовались той же эпитопной специфичностью, что и конкретное антитело мыши, такое как одно из моноклональных антител мыши, описанных в примерах. Можно также провести скрининг антител человека в отношении конкретной эпитопной специфичности посредством применения в качестве антигена-мишени только фрагмента тау, такого как фрагмент тау, содержащий исключительно остатки аминокислот 55-78, 60-75, 61-70, 55-69 или 64-78 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 113-136, 118-133, 119-128, 113-127 или 122-136, соответственно, SEQ ID NO: 1), и/или посредством проведения скрининга антител против совокупности вариантов тау, таких как варианты тау, содержащие различные мутации в пределах остатков аминокислот 55-78, 60-75, 61-70, 55-69 или 64-78 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 113-136, 118-133, 119-128, 113-127 или 122-136, соответственно, SEQ ID NO: 1).

Способы получения антител человека включают триомы согласно публикациям Oestberg et al., *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, патент США № 4634664; и Engleman et al., патент США 4634666, применение трансгенных мышей, содержащих гены иммуноглобулина человека (см., например, публикации Lonberg et al., WO 93/12227 (1993); US 5877397; US 5874299; US 5814318; US 5789650; US 5770429; US 5661016; US 5633425; US 5625126; US 5569825; US 5545806; Neuberger, *Nat. Biotechnol.*, 14:826 (1996); и Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)), способы фагового дисплея (см., например, публикации Dower et al., WO 91/17271; McCafferty et al., WO 92/01047; US 5877218; US 5871907; US 5858657; US 5837242; US 5733743; и US 5565332); и способы, описанные в публикации WO 2008/081008 (например, иммортализация В-клеток памяти, выделенных от человека, например, с помощью ВЭБ (вируса Эпштейна-Барр), проведение скрининга в отношении желаемых свойств и клонирование и экспрессия рекомбинантных форм).

F. Выбор константной области.

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

Одна или несколько аминокислот на аминокислотном или карбоксильном конце легкой и/или тяжелой цепи, такие как С-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или могут быть дериватизированными в части молекул или во всех молекулах. В константные области могут быть внесены замены для снижения

или повышения эффекторной функции, такой как опосредованная комплементом цитотоксичность или АЗКЦ (см., например, публикации Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597; и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 103:4005, 2006), или для увеличения периода полужизни у человека (см., например, публикацию Hinton et al., J. Biol. Chem., 279:6213, 2004). Иллюстративные замены включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428 (в данном абзаце для константной области используется нумерация EU) для увеличения периода полужизни антитела. Замена в любом или всех положениях 234, 235, 236 и/или 237 снижает аффинность в отношении рецепторов Fcγ, в частности рецептора FcγRI (см., например, US 6624821). Замену аланина в положениях 234, 235 и 237 IgG1 человека можно применять для снижения эффекторных функций. Некоторые антитела содержат замену аланина в положениях 234, 235 и 237 IgG1 человека для снижения эффекторных функций. Необязательно положения 234, 236 и/или 237 в IgG2 человека замещены аланином, а положение 235 - глутамином (см., например, публикацию US 5624821). В некоторых антителах применяют мутацию в одном или нескольких из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331 IgG1 человека согласно нумерации EU. В некоторых антителах применяют мутацию в одном или нескольких из положений 318, 320 и 322 IgG1 человека согласно нумерации EU. В некоторых антителах положения 234 и/или 235 замещены аланином и/или положение 329 замещено глицином. В некоторых антителах положения 234 и 235 замещены аланином. В некоторых антителах изотип представляет собой IgG2 или IgG4 человека.

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

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

Г. Экспрессия рекомбинантных антител.

Известно множество способов получения химерных и гуманизированных антител с применением экспрессирующей антитела линии клеток (например, гибридомы). Например, вариабельные области иммуноглобулина антител можно клонировать и секвенировать с применением хорошо известных способов. В одном способе вариабельную область VH тяжелой цепи клонируют посредством ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) с применением мРНК, полученной из клеток гибридомы. Консенсусные праймеры применяют в отношении лидерного пептида области VH, содержащего кодон инициации трансляции в качестве 5'-праймера и специфичный к константной области g2b 3'-праймер. Иллюстративные праймеры описаны в публикации патента США US 2005/0009150 автора Schenk et al. (здесь и далее "Schenk"). Последовательности из множества независимо полученных клонов можно сравнить, чтобы убедиться, что в течение амплификации не были введены изменения. Последовательность области VH можно также определить или подтвердить посредством секвенирования фрагмента VH, полученного посредством методологии 5'-RACE ОТ-ПЦР и 3' g2b-специфичного праймера.

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

Согласно одному подходу вариабельные области тяжелой и легкой цепей реконструируют, чтобы они кодировали сплайс-донорные последовательности ниже по течению от соответствующих соединений VDJ или VJ, и клонируют в вектор экспрессии млекопитающего, такой как pCMV-hy1 для тяжелой цепи и pCMV-Mc1 для легкой цепи. Данные векторы кодируют константные области γ1 и Cκ человека в виде экзонных фрагментов ниже по течению от встроенной кассеты вариабельной области. После подтверждения последовательности клетки CHO можно котрансфицировать векторами экспрессии тяжелой цепи и легкой цепи для получения химерных антител. Кондиционированную среду собирают через 48 ч после трансфекции и анализируют методом вестернблоттинга в отношении продукции антитела или методом ELISA в отношении связывания с антигеном. Химерные антитела являются гуманизированными, как описано выше.

Химерные, венированные, гуманизированные антитела и антитела человека, как правило, получают

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

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

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

Клетки млекопитающих можно применять для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. руководство Winnacker, *From Genes to Clones* (VCH Publishers, NY, 1987). Было разработано множество подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и такие линии клеток-хозяев включают линии клеток CHO, различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и не продуцирующие антитела миеломы, включая Sp2/0 и NS0. Клетки могут являться отличными от клеток человека. Векторы экспрессии для данных клеток могут содержать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.*, 89:49 (1986)), и необходимые информационные сайты процессинга, такие как сайты связывания рибосомы, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминатора транскрипции. Последовательности контроля экспрессии могут содержать промоторы, полученные из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего папилломавируса и т.п. См. публикацию Co et al., *J. Immunol.*, 148:1149 (1992).

В качестве альтернативы кодирующие антитело последовательности можно встроить в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоко трансгенного животного (см., например, патент США № 5741957; патент США № 5304489; и патент США № 5849992). Подходящие трансгены включают кодирующие последовательности для легкой и/или тяжелой цепей, функционально связанные с промотором и энхансером из гена, специфичного к молочной железе, такого как казеин или бета-лактоглобулин.

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

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

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

Можно применять методологии для коммерческого получения антител, включая оптимизацию кодона, отбор промоторов, отбор элементов транскрипции, отбор терминаторов, бессывороточное одноклеточное клонирование, создание банков клеток, использование селективных маркеров для амплификации числа копий, терминатор CHO или улучшение титров белков (см., например, публикации US 5786464; US 6114148; US 6063598; US 7569339; WO2004/050884; WO2008/012142; WO2008/012142; WO2005/019442; WO2008/107388; WO2009/027471; и US 5888809).

IV. Активные иммуногены.

Средство, применяемое для активной иммунизации, выступает для индукции у пациента тех же типов антитела, как описано выше применительно к пассивной иммунизации. Средства, применяемые для активной иммунизации, могут относиться к тем же типам иммуногенов, которые применяют для продукции моноклональных антител у лабораторных животных, например пептид из 3-15, или 3-12, или 5-12, или 5-8 смежных аминокислот из области тау, соответствующий остаткам 55-78, 60-75, 61-70, 55-69 или 64-78 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 113-136, 118-133, 119-128, 113-127 или 122-136, соответственно, SEQ ID NO: 1), такой как, например, пептид, содержащий остатки 55-78, 60-75, 61-70, 55-69 или 64-78 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 113-136, 118-133, 119-128, 113-127 или 122-136, соответственно, SEQ ID NO: 1). Для индукции антител, связывающихся с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и 16G7, можно картировать специфичность эпитопа для данных антител (например, посредством исследования связывания с сериями перекрывающихся пептидов, охватывающих тау). Затем фрагмент тау, состоящий из эпитопа, или содержащий эпитоп, или перекрывающийся с эпитопом, можно применять в качестве иммуногена. Такие фрагменты, как правило, применяют в нефосфорилированной форме.

Гетерологичный носитель и адъювант в случае использования могут являться такими же, которые применяли для получения моноклонального антитела, но могут также быть выбранными для лучшей фармацевтической пригодности с целью применения у человека. Подходящие носители включают сывороточные альбумины, гемоцианин фисуреллы, молекулы иммуноглобулина, тироглобулин, овальбумин, столбнячный анатоксин или анатоксин другой патогенной бактерии, такой как дифтерийный анатоксин (например, CRM197), анатоксин *E.coli*, холерный или *H.pylori*, или аттенуированное производное токсина. Т-клеточные эпитопы также являются подходящими молекулами-носителями. Некоторые конъюгаты могут быть образованы посредством связывания средств согласно настоящему изобретению с иммуностимулирующей полимерной молекулой (например, трипальмитоил-S-глицерин цистеином (Pam₃Cys), маннаном (полимером маннозы) или глюканом (β 1 $\rightarrow$ 2 полимер)), цитокинами (например, ИЛ-1, α - и β -пептидами ИЛ-1, ИЛ-2, γ -ИФН, ИЛ-10, ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором)) и хемокинами (например, MIP1- α и β , и RANTES). Иммуногены могут быть соединены с носителями посредством спейсерных аминокислот (например, gly-gly) или без них. Дополнительные носители включают вирусоподобные частицы. Вирусоподобные частицы (ВПЧ), также называемые псевдовирioнами или полученными из вирусов частицами, представляют собой субъединичные структуры, состоящие из множества копий вирусного капсида и/или белка оболочки, способного к самосборке *in vivo* в ВПЧ определенной сферической симметрии. (Powilleit et al. (2007), PLoS ONE, 2(5):e415.) В качестве альтернативы пептидные иммуногены можно присоединить к по меньшей мере одному искусственному Т-клеточному эпитопу, способному к связыванию с большей частью молекул МНС Класса II, такому как универсальный DR-эпитоп ("PADRE"). PADRE описан в публикациях US 5736142, WO 95/07707; и Alexander J. et al., Immunity, 1:751-761 (1994). Активные иммуногены могут быть представлены в мультимерной форме, в которой множество копий иммуногена и/или его носителя представлены в виде одной ковалентной молекулы.

Фрагменты часто вводят с фармацевтически приемлемыми адъювантами. Адъювант повышает титр индуцированных антител и/или аффинность связывания индуцированных антител по сравнению с ситуацией, когда пептид применяют сам по себе. Множество адъювантов можно применять в комбинации с иммуногенным фрагментом тау для вызова иммунного ответа. Предпочтительные адъюванты увеличивают внутренний ответ на иммуноген, не вызывая конформационных изменений в иммуногене, влияющих на качественную форму ответа. Предпочтительные адъюванты включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия, 3 De-O-ацилированный монофосфорил-липид А (MPLTM) (см. GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Гамильтон, Монтана, сейчас часть Corixa). StimulonTM QS-21 представляет собой тритерпеновый гликозид или сапонин, выделенный из коры дерева *Quillaja Saponaria Molina*, растущего в Южной Америке (см. публикацию Kensil et al., in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5057540), (Aquila BioPharmaceuticals, Фраминген, Массачусетс; сейчас Antigenics, Inc., Нью-Йорк, Нью-Йорк). Другие адъюванты представляют собой эмульсии "масло в воде" (такие как сквален или арахисовое масло), необязательно в комбинации с иммуностимулирующими средствами, такими как монофосфорил-липид А (см. публикацию Stoute et al., N. Engl. J. Med., 336, 86-91 (1997)), плюрониновые полимеры и убитые микобактерии. Адъюванты Ribi представляют собой эмульсии "масло в воде". Ribi содержит метаболизированное масло (сквален), эмульгированное с солевым раствором, содержащим Tween 80. Ribi также со-

держит очищенные микобактериальные продукты, которые действуют в качестве иммуностимулирующих средств, и бактериальный монофосфорил-липид А. Другим адъювантом является CpG (WO 98/40100). Адъюванты можно вводить в виде компонентов терапевтической композиции совместно с активным средством или можно вводить отдельно перед, во время или после введения терапевтического средства.

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

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

ДНК можно доставить в "оголенной" форме (т.е. без коллоидных или инкапсулирующих материалов). В качестве альтернативы можно применять несколько систем вирусных векторов, включая ретровирусные системы (см., например, публикацию Lawrie and Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.*, 3, 102-109 (1993)); аденовирусные векторы (см., например, публикацию Bett et al., *J. Virol.*, 67, 591-1 (1993)); аденоассоциированные вирусные векторы (см., например, публикацию Zhou et al., *J. Exp. Med.*, 179, 1867 (1994)), вирусные векторы из семейства покс, включая вирус осповакцины и поксвирусы птиц, вирусные векторы из рода альфа-вирусов, такие как таковые, полученные из вирусов Синдбис и вируса леса Семлики (см., например, публикацию Dubensky et al., *J. Virol.*, 70, 508-519 (1996)), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (см. US 5643576) и рабдовирусы, такие как вирус везикулярного стоматита (см. WO 96/34625) и папилломавирусы (Ohe et al., *Human Gene Therapy*, 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629; и Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.*, 24, 2630-2622 (1996)).

ДНК, кодирующую иммуноген, или вектор, содержащий ДНК, можно упаковать в липосомы. Подходящие липиды и родственные аналоги описаны в публикациях US 5208036, US 5264618, US 5279833 и US 5283185. Векторы и ДНК, кодирующую иммуноген, можно также нанести на носители в форме частиц или связать с такими носителями, примеры которых включают полимеры на основе полиметилметакрилата и полилактоиды, а также поли(лактоид-ко-гликолиды) (см., например, публикацию McGee et al., *J. Micro Encap.*, 1996).

Н. Скрининговые анализы антител.

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

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

Также можно проводить скрининг антител или активных иммуногенов на моделях заболеваний,

связанных с тау, на трансгенных животных. Такие трансгенные животные могут содержать трансген тау (например, любую из изоформ человека) и необязательно трансген APP человека, среди прочих, такой как киназа, которая фосфорилирует тау, ApoE, пресенилин или альфа-синуклеин. Такие трансгенные животные предрасположены к развитию по меньшей мере одного признака или симптома заболевания, связанного с тау.

Иллюстративное трансгенное животное представляет собой линию мышей K3 (Itner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 105(41):15997-6002 (2008)). Данные мыши содержат трансген тау человека с мутацией K369 I (мутация связана с болезнью Пика) и промотор Thy 1.2. Данная модель демонстрирует быстрое течение нейродегенерации, двигательный дефект и дегенерацию афферентных волокон и гранулярных клеток мозжечка. Другое иллюстративное животное представляет собой линию мышей JNPL3. Данные мыши содержат трансген тау человека с мутацией P301L (мутация связана с лобно-височной деменцией) и промотор Thy 1.2 (Taconic, Germantown, NY, Lewis et al., Nat. Genet., 25:402-405 (2000)). Данные мыши характеризуются более ступенчатым течением нейродегенерации. У мышей развиваются нейрофибриллярные клубки в нескольких областях головного мозга и спинного мозга, публикация полностью включена посредством ссылки. Данная модель представляет собой превосходную модель для исследования последствий развития клубков и для скрининговой терапии, которая может ингибировать образование данных агрегатов. Другим преимуществом данных животных является относительно ранняя манифестация патологии. В гомозиготной линии можно наблюдать поведенческие аномалии, связанные с патологией тау, по меньшей мере уже в 3 месяца, но животные остаются относительно здоровыми по меньшей мере до возраста 8 месяцев. Другими словами, в 8 месяцев животные передвигаются, питаются и могут выполнять поведенческие задания достаточно хорошо для обеспечения мониторинга эффектов лечения. Активная иммунизация данных мышей в течение 6-13 месяцев с помощью AI wI KLN-PHF-1 позволяла получить титры приблизительно 1000 и продемонстрировала более редкие нейрофибриллярные клубки, меньше pSer422 и уменьшенное снижение веса по сравнению с контрольными мышами, которые не получали лечение.

Активность антител или активных средств можно оценить посредством различных критериев, включая снижение количества суммарного тау или фосфорилированного тау, снижение других патологических характеристик, таких как отложения амилоида A β , и ингибирование или отсрочивание поведенческого дефицита. Активные иммуногены также можно исследовать в отношении индукции антител в сыворотке. Как пассивные, так и активные иммуногены можно исследовать в отношении прохождения антител через гематоэнцефалический барьер в головной мозг трансгенного животного. Антитела или фрагменты, индуцирующие антитело, можно также исследовать на приматах, отличных от человека, у которых природным путем или в результате индукции развиваются симптомы заболеваний, которые характеризуются тау. Исследования в отношении антитела или активного средства обычно проводят в сочетании с контролем, в котором проводят параллельный эксперимент, за исключением того что антитело или активное средство отсутствует (например, заменены наполнителем). Затем снижение, отсрочивание или ингибирование признаков или симптомов заболевания, вызываемое антителом или активным средством, исследование которого проводят, можно оценить по сравнению с контролем.

VI. Пациенты, поддающиеся лечению.

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

Пациенты, поддающиеся лечению, включают индивидуумов, подверженных риску развития заболевания, но у которых не наблюдаются симптомы, а также пациентов, у которых на сегодняшний день наблюдаются симптомы. Пациенты, подверженные риску развития заболевания, включают таковых, которые подвержены известному генетическому риску развития заболевания. Такие индивидуумы включают таковых, родственники которых страдали от данного заболевания, и таковых, риск которых был определен в результате анализа генетических или биохимических маркеров. Генетические маркеры риска

включают мутации в тау, такие как мутации, обсуждавшиеся выше, а также мутации в других генах, связанные с неврологическим заболеванием. Например, аллель ApoE4 в гетерозиготной, а еще более в гомозиготной форме связана с риском развития болезни Альцгеймера. Другие маркеры риска болезни Альцгеймера включают мутации в гене APP, в частности мутации в положениях 717 и положениях 670 и 671, которые называют мутациями Hardy и Swedish соответственно, мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, семейный анамнез БА (болезни Альцгеймера), гиперхолестеринемия или атеросклероз. Индивидуумов, которые на сегодняшний день страдают от болезни Альцгеймера, можно распознать посредством визуализации ПЭТ, на основании характерной деменции, а также присутствия факторов риска, описанных выше. Помимо этого, для идентификации индивидуумов, которые страдают от БА, доступно множество диагностических тестов. Данные тесты включают измерение уровней тау или фосфо-тау и A β 42 в СМЖ. Повышенные уровни тау или фосфо-тау и сниженные уровни A β 42 свидетельствуют о присутствии БА. Некоторые мутации связаны с болезнью Паркинсона. С болезнью Паркинсона связаны Ala30Pro или Ala53 либо мутации в других генах, таких как киназа с богатыми лейцином повторами, PARK8. Любое из неврологических заболеваний, упомянутых выше, можно также диагностировать у индивидуумов на основании критериев DSM IV TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition, text revision, Диагностическое и статистическое руководство по психическим расстройствам, четвертая редакция, пересмотренная).

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

I. Нуклеиновые кислоты.

В настоящем изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любую из тяжелой и легкой цепей, описанных выше (например, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11). Необязательно такие нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, и их можно экспрессировать с сигнальным пептидом, присоединенным к константной области. Кодирующие последовательности нуклеиновых кислот могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, таких как промотор, энхансер, сайт связывания рибосомы, сигнал терминации транскрипции и т.п. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи, могут существовать в выделенной форме либо их можно клонировать в одном или нескольких векторах. Нуклеиновые кислоты можно синтезировать посредством, например, твердофазного синтеза или ПНР с перекрывающимися олигонуклеотидами. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи, можно соединить в виде одной непрерывной нуклеиновой кислоты, например, в векторе экспрессии, или такие нуклеиновые кислоты могут являться отдельными, например, каждую из них клонируют в свой собственный вектор экспрессии.

J. Конъюгированные антитела.

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

Например, такие антитела можно конъюгировать с другими терапевтическими агентами, другими белками, другими антителами и/или обнаруживаемыми метками. См. публикации WO 03/057838; US 8455622. Такие терапевтические агенты могут представлять собой любое средство, которое можно применять для лечения, борьбы, облегчения, предотвращения или улучшения нежелательного состояния

или заболевания у пациента, такого как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

Конъюгированные терапевтические агенты могут включать цитотоксические средства, цитостатические средства, нейротрофические средства, нейропротекторные средства, радиотерапевтические средства, иммуномодулирующие средства или любые биологически активные средства, которые облегчают или усиливают активность антитела.

Цитотоксическое средство может представлять собой любое средство, которое является токсичным в отношении клетки. Цитостатическое средство может представлять собой любое средство, которое ингибирует пролиферацию клеток. Нейротрофическое средство может представлять собой любое средство, включая химические или белковые средства, которое стимулирует сохранение, рост или дифференциацию нейронов. Нейропротекторное средство может представлять собой средство, включая химические или белковые средства, которое защищает нейроны от острого инсульта или дегенеративных процессов. Иммуномодулятор может представлять собой любое средство, которое стимулирует или ингибирует развитие или поддержание иммунологического ответа. Радиотерапевтическое средство может представлять собой любую молекулу или соединение, которое испускает излучение. Если такие терапевтические агенты соединены со специфичным антителом против тау, таким как антитела, описанные в настоящем документе, присоединенные терапевтические агенты будут обладать специфичной аффинностью в отношении клеток, пораженных вызванным тау заболеванием, по сравнению с нормальными клетками. Как следствие, введение конъюгированных антител непосредственно нацеливается на клетки рака с минимальным повреждением окружающей нормальной здоровой ткани. Данный подход может быть в особенности подходящим для терапевтических агентов, которые являются слишком токсичными, чтобы их можно было вводить сами по себе. Помимо этого, можно применять более низкие количества терапевтических агентов.

Некоторые такие антитела можно модифицировать, чтобы они действовали в качестве иммунотоксичных. См., например, патент США № 5194594. Например, ридин, клеточный токсин, полученный из растений, можно объединить с антителами с применением бифункциональных реактивов S-ацетилмеркаптоэтантарного ангидрида для антитела и сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионата для ридина. См. публикацию Pietersz et al., *Cancer Res.*, 48(16):4469-4476 (1998). Объединение приводит к утрате связывающей активности В-цепи ридина, при этом не нарушая ни токсичный потенциал А-цепи ридина, ни активность антитела. Аналогично сапорин, ингибитор сборки рибосом, можно присоединить к антителам посредством дисульфидной связи между введенными химическим способом сульфгидрильными группами. См. публикацию Polito et al., *Leukemia*, 18:1215-1222 (2004).

Некоторые такие антитела можно присоединить к радиоактивным изотопам. Примеры радиоактивных изотопов включают, например, иттрий⁹⁰ (⁹⁰Y), индий¹¹¹ (¹¹¹In), ¹³¹I, ⁹⁹mTc, радиоактивное серебро-111, радиоактивное серебро-199 и висмут²¹³.

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

Некоторые такие антитела можно присоединить к другим терапевтическим агентам. Такие терапевтические агенты могут являться, например, цитотоксическими, цитостатическими, нейротрофическими или нейропротекторными. Например, антитела можно конъюгировать с токсичными химиотерапевтическими лекарственными препаратами, такими как майтансин, гелданамицин, ингибиторы тубулина, такие как средства, связывающие тубулин (например, ауристатины), или средства, связывающиеся с малой бороздой, такие как калихеамицин. Другие типичные терапевтические агенты включают средства, которые, как известно, являются подходящими для лечения, ведения или облегчения болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП).

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

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

Антитела можно также объединить с обнаруживаемой меткой. Такие антитела можно применять, например, для диагностики болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), и/или для оценки эффективности лечения. Такие антитела являются в особенности подходящими для осуществления такого определения у субъектов, которые страдают от или предрасположены к болезни Альцгеймера, синдрому Дауна, легким когнитивным нарушениям, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитическому паркинсонизму, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерному параличу, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофическому латеральному склерозу/комплексу паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианту болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующему надъядерному параличу (ПНП), или в соответствующих биологических образцах, полученных от таких субъектов. Типичные обнаруживаемые метки, которые можно объединить с антителом или присоединить к антителу, включают различные ферменты, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как люминол; биолюминесцентные материалы, такие как люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, такие как радиоактивное серебро-111, радиоактивное серебро-199, висмут²¹³, иод (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), технеций (⁹⁹Tc), таллий (²⁰¹Tl), галлий (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), палладий (¹⁰³Pd), молибден (⁹⁹Mo), ксенон (¹³³Xe), фтор (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn и ¹¹⁷Ti; позитронно-активные металлы с применением различных вариантов позитронно-эмиссионной томографии; нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов; и молекулы, которые являются радиоактивно мечеными или конъюгированными со специфичными радиоактивными изотопами.

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

Терапевтические агенты, другие белки, другие антитела и/или обнаруживаемые метки могут быть объединены или конъюгированы напрямую или опосредованно с применением посредника (например, линкера) с антителом согласно настоящему изобретению. См., например, публикации Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Deliv-

ery," in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), p. 623-53 (Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), p. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), p. 303-16 (Academic Press 1985); и Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Подходящие линкеры включают, например, отщепляемые и неотщепляемые линкеры. Можно применять различные линкеры, которые высвобождают присоединенные терапевтические агенты, белки, антитела и/или обнаруживаемые метки в кислых или восстанавливающих условиях при воздействии специфичных протеаз или при других определенных условиях.

VI. Фармацевтические композиции и способы применения.

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

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

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

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

Количество средства для активного введения варьирует от 0,1-500 мкг на пациента и более часто от 1-100 или 1-10 мкг на инъекцию для введения человеку. Время между введением инъекций может варьировать в значительной степени от одного раза в день до одного раза в год, до одного раза в десять лет. Типичный режим состоит из иммунизации с последующими бустер-инъекциями через интервалы времени, такие как интервалы 6 недель или два месяца. Другой режим состоит из иммунизации с последующими бустер-инъекциями через 1, 2 и 12 месяцев. Другой режим предусматривает инъекцию один раз в два месяца в течение жизни. В качестве альтернативы бустер-инъекции можно вводить нерегулярно, как показано на основании мониторинга иммунного ответа.

Антитела или средства для индукции антител предпочтительно вводят периферическим путем (т.е. единица, в которой вводят или которая индуцирует антитело, пересекает гематоэнцефалический барьер для достижения предназначенного участка в головном мозге). Пути введения включают местный, внутривенный, пероральный, подкожный, внутриартериальный, внутричерепной, интратекальный, интраперитонеальный, интраназальный, внутриглазной или внутримышечный. Предпочтительными путями введения антител являются внутривенный и подкожный.

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

Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стериль-

ными и по существу изотоническими, и их производят в условиях GMP (Good manufacturing practices, надлежащей производственной практики). Фармацевтические композиции могут быть предложены в единичной дозированной форме (т.е. дозе для однократного введения). Фармацевтические композиции можно приготовить в состав с применением одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ или вспомогательных средств. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекции антитела можно приготовить в состав в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой раствор или ацетатный буфер (для снижения неприятных ощущений в участке инъекции). Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. В качестве альтернативы антитела могут находиться в лиофилизированной форме для восстановления перед применением подходящим наполнителем, например стерильной апиrogenной водой.

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

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

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

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

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

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

А. Способы диагностики и мониторинга.

Способы визуализации, диагностики *in vivo* и оптимизации иммунотерапии.

В настоящем изобретении предложены способы визуализации отложений тау-белка (например, нейрофибриллярных клубков и включений тау) у пациента *in vivo*. Способы осуществляют посредством введения реактива, такого как антитело, которое связывается с тау (например, антитело 16G7 мыши, гу-

манизированное, химерное или венированное антитело 16G7), пациенту, а затем посредством обнаружения средства после его связывания. В некоторых способах антитело связывается с эпитопом тау в пределах остатков аминокислот 55-78 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 113-136 SEQ ID NO: 1). В некоторых способах антитело связывается с эпитопом в пределах остатков аминокислот 60-75 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 118-133 SEQ ID NO: 1) или в пределах остатков аминокислот 61-70 SEQ ID NO: 3 (соответствуют остаткам аминокислот 119-128 SEQ ID NO: 1). Клирингового ответа на введенные антитела можно избежать или его можно снизить с применением фрагментов антитела, в которых отсутствует полноразмерная константная область, таких как Fab. В некоторых способах одно и то же антитело может выступать в качестве реактива как для лечения, так и для диагностики.

Диагностические реактивы можно вводить посредством внутривенной инъекции в организм пациента либо непосредственно в головной мозг с помощью внутривенной инъекции или посредством сверления отверстия в черепе. Доза реактива должна находиться в тех же диапазонах, как и для способов лечения. Как правило, реактив является меченым, несмотря на то что в некоторых способах первичный реактив с аффинностью в отношении тау является немеченым, и для связывания с первичным реактивом применяют вторичное средство мечения. Выбор метки зависит от способов обнаружения. Например, флуоресцентная метка является подходящей для оптического обнаружения. Применение парамагнитных меток является подходящим для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки можно также обнаружить с применением позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

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

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

У некоторых пациентов диагностику таупатии можно облегчить посредством осуществления сканирования ПЭТ. Сканирование ПЭТ можно осуществить с применением, например, общепринятого аппарата для визуализации ПЭТ и вспомогательного оборудования. Сканирование, как правило, охватывает одну или несколько областей головного мозга, которые, как известно, обычно связаны с отложениями тау-белка, и одну или несколько областей, в которых, как правило, присутствует небольшое количество (в случае наличия) отложений и которые выступают в качестве контролей.

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

В некоторых способах сканирование ПЭТ проводят одновременно или в ходе того же визита пациента, что и сканирование МРТ (магнитно-резонансной томографии) или КТ (компьютерной томографии). Сканирование МРТ или КТ позволяет получить больше информации об анатомических деталях голов-

го мозга, чем сканирование ПЭТ. Однако изображение от сканирования ПЭТ можно наложить на изображение от сканирования МРТ или КТ, чтобы более точно указать расположение лиганда ПЭТ и логически выведенных отложений тау по сравнению с анатомическими структурами в головном мозге. Некоторые приборы могут осуществлять как сканирование ПЭТ, так и сканирование МРТ или КТ без изменения положения пациента между сканированием, что облегчает наложение изображений.

Подходящие лиганды ПЭТ включают меченные радиоактивной меткой антитела согласно настоящему изобретению (например, антитело 16G7 мыши, гуманизированное, химерное или венированное антитело 16G7). Используемый радиоактивный изотоп может представлять собой, например, C^{11} , N^{13} , O^{15} , F^{18} или I^{123} . Интервал между введением лиганда ПЭТ и осуществлением сканирования может зависеть от лиганда ПЭТ и, в частности, его скорости поглощения и клиренса в головной мозг, а также периода полужизни его радиоактивной метки.

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

Профилактическое сканирование можно осуществлять с интервалами, например, от 6 месяцев до 10 лет, предпочтительно 1-5 лет. У некоторых пациентов профилактическое сканирование проводят ежегодно. Если сканирование ПЭТ, проведенное в качестве профилактической меры, свидетельствует об аномально высоких уровнях отложений тау-белка, можно начинать применение иммунотерапии и проводить последующие сканирования ПЭТ, как для пациентов, у которых была диагностирована таупатия. Если сканирование ПЭТ, проведенное в качестве профилактической меры, свидетельствует об уровнях отложений тау-белка в пределах нормы, можно проводить последующие сканирования ПЭТ с интервалами от 6 месяцев до 10 лет, предпочтительно 1-5 лет, как и ранее, либо в ответ на появление признаков и симптомов таупатии или легкого когнитивного нарушения. Посредством сочетания профилактического сканирования с введением направленной на тау иммунотерапии, если и когда были обнаружены отложения тау-белка выше нормального уровня, уровни отложений тау-белка можно снизить до нормальных уровней или близко к ним или по меньшей мере ингибировать их повышение в дальнейшем, и пациент может оставаться свободным от таупатии в течение более длительного периода времени, чем в случае, если он не получает профилактическое сканирование и направленную на тау иммунотерапию (например, по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 лет, или в течение оставшейся жизни пациента).

Нормальные уровни отложений тау-белка можно определить на основании количества нейрофибриллярных клубков или включений тау в головном мозге репрезентативного образца от индивидуумов в общей популяции, у которых не была диагностирована конкретная таупатия (например, болезнь Альцгеймера) и которые, как считают, не подвержены повышенному риску развития такого заболевания (например, репрезентативный образец не страдающих от заболевания индивидуумов в возрасте до 50 лет). В качестве альтернативы нормальный уровень можно определить у индивидуального пациента, если сигнал ПЭТ в соответствии со способами согласно настоящему изобретению в области головного мозга, в которой, как известно, развиваются отложения тау-белка, не отличается (в пределах точности измерения) от сигнала из области головного мозга, в которой, как известно, такие отложения в норме не развиваются. Повышенный уровень у индивидуума можно определить посредством сравнения с нормальными уровнями (например, за пределами среднего значения и вариации стандартного отклонения) или просто на основании повышенного сигнала за пределами погрешности эксперимента в области головного мозга, связанной с отложениями тау-белка, по сравнению с областью, которая, как известно, не связана с отложениями. С целью сравнения уровней отложений тау-белка у индивидуума и популяции отложения тау-белка предпочтительно должны быть определены в одной и той же области или областях головного мозга, причем данные области включают по меньшей мере одну область, в которой, как известно, образуются отложения тау-белка, связанные с конкретной таупатией (например, болезнью Альцгеймера). Пациент, у которого наблюдается повышенный уровень отложений тау-белка, является кандидатом для начала иммунотерапии.

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

Сохранение отложений тау-белка на приблизительно постоянном уровне или даже незначительное

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

Мониторинг изменений отложений тау-белка позволяет откорректировать иммунотерапию или другой режим лечения в ответ на лечение. Мониторинг ПЭТ обеспечивает указание на природу и степень ответа на лечение. Затем можно определить, нужно ли корректировать лечение, и в случае необходимости лечение можно откорректировать в ответ на мониторинг ПЭТ. Таким образом, мониторинг ПЭТ позволяет откорректировать направленную на тау иммунотерапию или другой режим лечения до того, как другие биомаркеры, МРТ или когнитивные показатели продемонстрировали обнаруживаемые ответы. Значительное изменение означает, что сравнение значения параметра после лечения по сравнению с исходным уровнем обеспечивает некоторое доказательство, что лечение привело или не привело к благоприятному эффекту. В некоторых случаях изменение значений параметра у пациента само по себе обеспечивает доказательство, что лечение привело или не привело к благоприятному эффекту. В других случаях изменение значений (в случае наличия) у пациента сравнивают с изменением значений (в случае наличия) в репрезентативной контрольной популяции пациентов, которые не получали иммунотерапию. Разница между ответом конкретного пациента и нормальным ответом контрольного пациента (например, среднее значение плюс дисперсия стандартного отклонения) может также обеспечить доказательство, что режим иммунотерапии достиг благоприятного эффекта для пациента или не достиг его.

У некоторых пациентов мониторинг свидетельствует об обнаруживаемом снижении отложений тау-белка, но данный уровень отложений тау-белка остается выше нормального. Для таких пациентов, если неприемлемые побочные эффекты отсутствуют, режим лечения можно продолжить без изменений или даже с увеличением частоты введения и/или дозы, если лечение уже не проводят при максимальной рекомендуемой дозе.

Если мониторинг свидетельствует об уровнях отложений тау-белка у пациента, которые уже были снижены до нормальных уровней или находятся вблизи от нормальных уровней отложений тау-белка, режим иммунотерапии можно откорректировать с такового для индукции (т.е. который снижает уровень отложений тау-белка) к таковому для сохранения (т.е. который поддерживает отложения тау-белка на приблизительно постоянном уровне). На такой режим можно влиять посредством снижения дозы и/или частоты введения иммунотерапии.

У других пациентов мониторинг может свидетельствовать, что иммунотерапия характеризуется некоторым благоприятным эффектом, но субоптимальным эффектом. Оптимальный эффект можно определить как процент снижения уровня отложений тау-белка в пределах верхней половины или квартиля изменения отложений тау-белка (измеренного или рассчитанного для всего головного мозга или его репрезентативной области или областей, в которых, как известно, образуются отложения тау-белка), наблюдаемого в репрезентативном образце от пациентов, страдающих от таупатии, которые получают иммунотерапию в данную временную точку после начала терапии. Пациента, который испытывает меньшее снижение, или пациента, отложения тау-белка у которого остаются постоянными или даже повышаются, но в меньшей степени, чем ожидается при отсутствии иммунотерапии (например, как измерено в контрольной группе пациентов, которым не вводят иммунотерапию), можно классифицировать как демонстрирующего положительный, но субоптимальный ответ. Таким пациентам можно необязательно откорректировать режим, при этом увеличивая дозу и/или частоту введения средства.

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

Вышеупомянутое описание диагностики, мониторинга и корректировки лечения таупатии главным образом сфокусировано на применении сканирования ПЭТ. Однако для осуществления таких способов можно применять любую другую методику для визуализации и/или измерения отложений тау-белка, подходящую для применения с антителами против тау согласно настоящему изобретению (например, антителом мыши, гуманизированным, химерным или венированным антителом 16G7), вместо сканирования ПЭТ.

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

В некоторых способах измерение антитела против тау на исходном уровне у субъекта проводят до введения, второе измерение проводят вскоре после этого для определения пикового уровня антитела, и одно или несколько последующих измерений проводят через интервалы времени для мониторинга снижения уровней антитела. Когда уровень антитела снизился до исходного уровня или заранее определенного процента пика менее исходного уровня (например, 50, 25 или 10%), проводят введение следующей дозы антитела. В некоторых способах пиковые или последующие измеренные уровни менее фонового уровня сравнивают с эталонными уровнями, ранее определенными, чтобы составить благоприятный режим профилактического или терапевтического лечения для других субъектов. Если измеренный уровень антитела является в значительной степени меньшим, чем эталонный уровень (например, меньшим, чем среднее значение минус одно или предпочтительно два стандартных отклонения от эталонного значения в популяции субъектов, получающих пользу от лечения), показано введение дополнительной дозы антитела.

Также предложены способы обнаружения тау у субъекта, например, посредством измерения тау в образце от субъекта или посредством визуализации тау у субъекта *in vivo*. Такие способы являются подходящими для диагностики или подтверждения диагноза заболеваний, связанных с тау, или предрасположенности к указанным заболеваниям. Способы можно также применять в отношении бессимптомных субъектов. Присутствие тау свидетельствует о предрасположенности к будущему симптоматическому заболеванию. Способы также являются подходящими для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение у субъектов, у которых ранее была диагностирована болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

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

IX. Наборы.

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

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

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

гие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Х. Другие варианты применения.

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

Помимо этого, антитела можно применять для обнаружения присутствия тау в биологическом образце для мониторинга и оценки эффективности терапевтического средства, которое применяют для лечения пациента, у которого была диагностирована болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). Биологический образец от пациента, у которого была диагностирована болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), оценивают для установления исходного уровня связывания антител с образцом (т.е. исходного уровня присутствия тау в образце) до начала терапии терапевтическим средством. В некоторых случаях несколько биологических образцов от пациента оценивают в различные периоды времени для установления как исходного уровня, так и показателя случайной вариации, не зависящей от лечения. Затем терапевтическое средство вводят в режиме. Режим может включать несколько введений средства в течение периода времени. Необязательно связывание антител (т.е. присутствие тау) оценивают в различные периоды времени в нескольких биологических образцах от пациента как для установления показателя случайной вариации, так и для демонстрации тенденции ответа на иммунотерапию. Затем сравнивают различные оценки связывания антитела с биологическими образцами. Если проводят только две оценки, можно провести прямое сравнение между двумя оценками для определения того, увеличено, снижено или остается аналогичным связывание антитела (т.е. присутствие тау) между двумя оценками. Если проводят более двух измерений, измерения можно проанализировать во временной динамике, начиная от момента до лечения терапевтическим средством и продолжая в течение курса терапии. В случае пациентов, у которых снизилось связывание антитела с биологическими образцами (т.е. присутствие тау), будет сделано заключение, что терапевтическое средство было эффективным при лечении болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП) у пациента. Снижение связывания антитела может являться статистически значимым. Необязательно связывание снижается по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Оценку связывания антитела можно проводить в сочетании с оценкой других признаков и симптомов болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической де-

менции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизма-деменция Гуам, кортикобазальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП).

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

Все патенты, веб-сайты, другие публикации, учетные номера и т.п., ссылки на которые содержатся выше или ниже, полностью включены посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждый из данных документов был конкретно и индивидуально указан как включенный посредством ссылки. Если различные версии последовательности связаны с учетным номером в разное время, то подразумевается версия, связанная с учетным номером на действительную дату подачи данной заявки. Действительная дата подачи заявки означает более раннюю из действительной даты подачи или даты подачи приоритетной заявки, ссылающейся на учетный номер, если это применимо. Аналогично если различные версии публикации, веб-сайта или т.п. опубликованы в разное время, то подразумевается версия, опубликованная самой последней на действительную дату подачи заявки, если не указано обратное. Любой признак, стадия, элемент, вариант реализации или аспект настоящего изобретения можно применять в комбинации с любым другим, если специально не указано обратное. Несмотря на то что настоящее изобретение описано достаточно подробно при помощи иллюстрации и примера с целью ясности и понимания, будет очевидно, что некоторые изменения и модификации могут быть произведены в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Идентификация моноклональных антител против тау.

Моноклональное антитело 16G7 получали согласно модификации способа Кохлера и Милштейна (G. Kohler, C. Milstein (1975), *Nature*, 256:495-497). Для всех инъекций и скрининговых анализов применяли тау человека, содержащий все 4 повтора, связывающих микротрубочки, в котором отсутствовали N-концевые сплайс-варианты (тау 4R0N, 383 аминокислот). Тау очищали из клеток SF9, инфицированных содержащей тау бакуловирусной конструкцией (J. Knops et al. (1991), *J. Cell Biol.*, 115(5):725-33). Мышам A/J в возрасте шесть недель инъецировали 100 мкг очищенного тау с интервалами в две недели. Тау эмульгировали в полном адъюванте Фрейнда для первой иммунизации и в неполном адъюванте Фрейнда для всех последующих иммунизаций. Образцы сыворотки отбирали через три дня после третьей инъекции для оценки титра у данных животных. Мыши с наивысшим титром внутривенно инъецировали 100 мкг тау в 500 мкл ФБР через две недели после получения ею третьей инъекции. Слияние миеломы происходило через три дня с применением в качестве партнера слияния SP2/0. Проводили скрининг супернатантов из лунок, содержащих клетки гибридомы, в отношении их способности вызывать преципитацию меченого ¹²⁵I тау. Тау радиоiodировали с применением иммобилизованной глюкозооксидазы и лактопероксидазы в соответствии с инструкциями производителя (Bio-Rad). Вкратце 10 мкг очищенного рекомбинантного тау метили радиоактивным способом с помощью 1 мКи Na I до специфической активности 20 мКи/мкг белка. 16G7 было идентифицировано как высокоаффинное моноклональное антитело, специфичное в отношении тау, и его клонировали посредством предельного разведения. Изотипы 16G7, как было определено, представляли собой гамма 1 каппа.

Пример 2. Картирование эпитопа антитела 16G7.

Для картирования антитела 16G7 мыши применяли диапазон перекрывающихся биотинилированных пептидов, охватывающих весь тау-белок человека 4R0N размером 383 а.к. (аминокислот). Дополнительные пептиды применяли для моделирования потенциальных посттрансляционных модификаций C- и N-терминальных концов белка.

Биотинилированные пептиды присоединяли к отдельным лункам планшета для ELISA, сенсibilизированного стрептавидином. Планшет блокировали и обрабатывали 16G7 мыши с последующей инкубацией с конъюгированным с пероксидазой хрена антителом против иммуноглобулинов мыши. После тщательной промывки на планшет наносили OPD и позволяли реакции развиваться. Считывание на планшетах проводили при поглощении 450 нм. Вычитание фона проводили с использованием значений поглощения из лунок, не содержащих первичное антитело, и порог для положительного связывания устанавливали на уровне 0,2 единиц поглощения.

Положительное связывание было обнаружено для пептида, охватывающего остатки аминокислот 55-69 SEQ ID NO: 3, и меньшее связывание было обнаружено в отношении пептида, охватывающего остатки аминокислот 64-78 SEQ ID NO: 3 (фиг. 1). С применением нумерации полноразмерного тау-белка человека 4R2N (441 аминокислота) (SEQ ID NO: 1) данные пептиды соответствуют остаткам аминокислот 113-127 и 122-136, соответственно, SEQ ID NO: 1.

Пример 3. Дизайн гуманизированных антител 16G7.

Исходной точкой или донорным антителом для гуманизации являлось антитело 16G7 мыши. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи зрелого m16G7 представлена в виде SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи зрелого m16G7 представлена в виде SEQ ID NO: 11. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно сводному определению Кэбота/Чотиа представлены в виде SEQ ID NO: 8-10 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи согласно Кэботу представлены в виде SEQ ID NO: 12-14 соответственно. Везде применяют нумерацию Кэбота.

Варибельная область каппа (Vk) 16G7 принадлежит к подгруппе 1 мыши согласно Кэботу, которая соответствует подгруппе 4 человека согласно Кэботу, и варибельная область тяжелой цепи (Vh) принадлежит к подгруппе 2b мыши согласно Кэботу, которая соответствует подгруппе 1 человека согласно Кэботу [Kabat E.A. et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication № 91-3242]. CDR-L1 согласно Чотиа из 17 остатков принадлежит к каноническому классу 3, CDR-L2 согласно Чотиа из 7 остатков - классу 1, CDR-L3 согласно Чотиа из 9 остатков - классу 1 в Vk [Martin A.C., Thornton J.M. (1996), J. Mol. Biol., 263:800-15. CDR-H1 согласно Чотиа из 10 остатков принадлежит классу 1, CDR-H2 согласно Чотиа из 17 остатков - классу 2 [Martin & Thornton, 1996]. CDR-H3 не содержит канонических классов, но петля размером 9 остатков, вероятно, содержит изогнутое основание согласно правилам Shirai et al. [Shirai H. et al. (1999), FEBS Lett., 455:188-97]. Проводили поиск среди последовательностей белков в базе данных PDB [Deshpande N. et al. (2005), Nucleic Acids Res., 33:D233-7] для нахождения структур, которые будут обеспечивать примерную структурную модель 16G7. Для построения Fv модели 16G7 использовали структуру FAB против О-антигена *Francisella tularensis* (код pdb 3UJT) [Rynkiewicz, M.J. et al. (2012), Biochemistry, 51:5684-5694] с разрешением 2,1 Å. Данная модель сохраняет ту же каноническую структуру для петель, как и 16G7. Для VLv1, VLv2 и VLv3 также применяли акцепторы VL человека AAB24404.1 и AEK69364.1 из поиска избыточных последовательностей белков в базе данных NCBI (согласно предыдущему правилу гуманизации МНН). Для VHv1, VHv2, VHv3, VHv4, VHv5V и VHv5VR также применяли акцепторы AAA18265.1 и ADW08092.1 из поиска избыточных последовательностей белков в базе данных NCBI (согласно предыдущему правилу гуманизации МНН).

Согласно правилу гуманизации антитела МНН 2015 г. [Jones, T.D. et al. (2016), The INNs and outs of antibody nonproprietary names. mAbs (<http://dx.doi.org/10.1080/19420862.2015.1114320>)] поиск в базе данных IMGT позволил выбрать подходящие каркасные участки зародышевой линии человека, в которые можно перенести CDR мыши. Для Vk была выбрана легкая цепь каппа человека с IMGT#IGKV4-1*01. Она характеризуется теми же каноническими классами для CDR-L1, CDR-L2 и L3 и принадлежит к подгруппе 1 каппа человека. Для Vh была выбрана тяжелая цепь человека с IMGT#IGHV1-2*02, которая принадлежит к подгруппе 1 тяжелой цепи человека. Она характеризуется канонической формой CDR-H1 и H2 16G7. VHv2a, VHv2b, VHv2aB7, VHv2bH7, VHv6a, VHv6b и VHv7 были разработаны с применением IMGT#IGHV1-2*02 в качестве акцептора.

Варианты последовательностей тяжелой и легкой цепей, которые получили в результате процесса гуманизации антитела, затем выравнивали с последовательностями зародышевой линии человека с применением инструмента IMGT Domain GapAlign для оценки степени гуманизации тяжелой и легкой цепей, как изложено в руководствах комитета МНН ВОЗ (WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review) (Интернет), 2014. Доступно по адресу: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>). Остатки заменяли для выравнивания с соответствующей последовательностью зародышевой линии человека, когда это возможно, для усиления степени гуманизации.

Конструировали 13 вариантов гуманизированной варибельной области тяжелой цепи и 3 варианта гуманизированной варибельной области легкой цепи, содержащие различные пер мутации замен (hu16G7VHv1, hu16G7VHv2, hu16G7VHv2a, 16G7VHv2aB7, hu16G7VHv2b, hu16G7VHv2bH7, hu16G7VHv3, hu16G7VHv4, hu16G7VHv5V, hu16G7VHv5VR, hu16G7VHv6a, hu16G7VHv6b и hu16G7VHv7 (SEQ ID NO: 15-27 соответственно) и hu16G7VLv1, hu16G7VLv2 и hu16G7VLv3 (SEQ ID NO: 28-30 соответственно) (табл. 4 и 3). Иллюстративные дизайны гуманизированных Vk и Vh с обратными мутациями и другими мутациями на основе отобранных каркасных областей человека представлены в табл. 3 и 4 соответственно. Заштрихованные серым области в табл. 3 и 4 отмечают CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа. SEQ ID NO: 15-27 и SEQ ID NO: 28-30 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в табл. 5. Аминокислоты в положениях

H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13,

H20, H31, H37, H38, H40, H48, H60, H64, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82s, H82b,

H83 и H85 в hu16G7VHv1, hu16G7VHv2, hu16G7VHv2a, 16G7VHv2aB7, hu16G7VHv2b,

hu16G7VHv2bH7, hu16G7VHv3, hu16G7VHv4, hu16G7VHv5V, hu16G7VHv5VR,

hu16G7VHv6a, hu16G7VHv6b и hu16G7VHv7

перечислены в табл. 6. Аминокислоты в положениях в L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43 и L48 hu16G7VLv1, hu16G7VLv2 и hu16G7VLv3 перечислены в табл. 7. Процент степени гуманизации для гу-

манизированных цепей

VH hu16G7VHv1, hu16G7VHv2, hu16G7VHv2a, 16G7VHv2aB7,

hu16G7VHv2b, hu16G7VHv2bH7, hu16G7VHv3, hu16G7VHv4, hu16G7VHv5V,

hu16G7VHv5VR, hu16G7VHv6a, hu16G7VHv6b и hu16G7VHv7

(SEQ ID NO: 15-27 соответственно) и гуманизированных цепей VL hu16G7VLv1, hu16G7VLv2 и hu16G7VLv3 (SEQ ID NO: 28-30 соответственно) представлен в табл. 8.

Таблица 3

№ остатка согласно Кэботу	Линейный № остатка	FR или CDR	VL 16G7 мыши (SEQ ID NO: 11)	Учетн. № IMGT акцепторного Fr VL человека #GKV4-I*01 (SEQ ID NO:36)	Hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28)	Hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29)	Hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	L	M	L	L	L
5	5	Fr1	S	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	S	D	S	S	S
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	A	A	A	A	A
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	S	S	S	S
15	15	Fr1	V	L	V	V	V
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	E	E	E	E	E
18	18	Fr1	K	R	K	R	K
19	19	Fr1	V	A	V	A	V
20	20	Fr1	T	T	T	T	T
21	21	Fr1	M	I	M	I	M
22	22	Fr1	S	N	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	V	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L

27D	31	CDR-L1	D	Y	D	D	D
27E	32	CDR-L1	G	S	G	G	G
27F	33	CDR-L1	N	S	N	N	N
28	34	CDR-L1	D	N	D	D	D
29	35	CDR-L1	Q	N	Q	Q	Q
30	36	CDR-L1	K	K	K	K	K
31	37	CDR-L1	N	N	N	N	N
32	38	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
33	39	CDR-L1	L	L	L	L	L
34	40	CDR-L1	A	A	A	A	A
35	41	Fr2	W	W	W	W	W
36	42	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
37	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
38	44	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	45	Fr2	K	K	K	K	K
40	46	Fr2	P	P	P	P	P
41	47	Fr2	G	G	G	G	G
42	48	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	49	Fr2	S	P	S	S	S
44	50	Fr2	P	P	P	P	P
45	51	Fr2	K	K	K	K	K
46	52	Fr2	L	L	L	L	L
47	53	Fr2	L	L	L	L	L
48	54	Fr2	M	I	M	I	I
49	55	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	56	CDR-L2	W	W	W	W	W
51	57	CDR-L2	A	A	A	A	A
52	58	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	59	CDR-L2	T	T	T	T	T
54	60	CDR-L2	R	R	R	R	R

55	61	CDR-L2	E	E	E	E	E
56	62	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	63	Fr3	G	G	G	G	G
58	64	Fr3	V	V	V	V	V
59	65	Fr3	P	P	P	P	P
60	66	Fr3	D	D	D	D	D
61	67	Fr3	R	R	R	R	R
62	68	Fr3	F	F	F	F	F
63	69	Fr3	T	S	S	S	S
64	70	Fr3	G	G	G	G	G
65	71	Fr3	S	S	S	S	S
66	72	Fr3	G	G	G	G	G
67	73	Fr3	S	S	S	S	S
68	74	Fr3	G	G	G	G	G
69	75	Fr3	T	T	T	T	T
70	76	Fr3	D	D	D	D	D
71	77	Fr3	F	F	F	F	F
72	78	Fr3	T	T	T	T	T
73	79	Fr3	L	L	L	L	L
74	80	Fr3	T	T	T	T	T
75	81	Fr3	I	I	I	I	I
76	82	Fr3	S	S	S	S	S
77	83	Fr3	S	S	S	S	S
78	84	Fr3	L	L	L	L	L
79	85	Fr3	K	Q	Q	Q	Q
80	86	Fr3	A	A	A	A	A
81	87	Fr3	E	E	E	E	E
82	88	Fr3	D	D	D	D	D
83	89	Fr3	L	V	V	V	V
84	90	Fr3	A	A	A	A	A

85	91	Fr3	V	V	V	V	V
86	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	93	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	94	Fr3	C	C	C	C	C
89	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
90	96	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	97	CDR-L3	F	Y	F	F	F
92	98	CDR-L3	Y	Y	Y	Y	Y
93	99	CDR-L3	D	S	D	D	D
94	100	CDR-L3	Y	T	Y	Y	Y
95	101	CDR-L3	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3					
95B		CDR-L3					
95C		CDR-L3					
95D		CDR-L3					
95E		CDR-L3					
95F		CDR-L3					
96	102	CDR-L3	W		W	W	W
97	103	CDR-L3	T		T	T	T
98	104	Fr4	F		F	F	F
99	105	Fr4	G		G	G	G
100	106	Fr4	G		G	G	G
101	107	Fr4	G		G	G	G
102	108	Fr4	T		T	T	T
103	109	Fr4	K		K	K	K
104	110	Fr4	L		L	L	L
105	111	Fr4	E		E	E	E
106	112	Fr4	I		I	I	I
106A	113	Fr4	K		K	K	K
107	114	Fr4	R		R	R	R

Таблица 4

№ остатка согласно Кэботу	Линейный № остатка	FR или CDR	VH 16G7 мьши (SEQ ID NO: 7)	Учетный № IMGT акцепторного FR VH человека #IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 33)	hul16G7VHv1 (SEQ ID NO:15)	hul16G7VHv2 (SEQ ID NO:16)	hul16G7VHv2a (SEQ ID NO:17)	16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18)	hul16G7VHv2b (SEQ ID NO:19)	hul16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO: 20)	hul16G7VHv3 (SEQ ID NO:21)	hul16G7VHv4 (SEQ ID NO:22)	hul16G7VHv5V (SEQ ID NO:23)	hul16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24)	hul16G7VHv6a (SEQ ID NO:25)	hul16G7VHv6b (SEQ ID NO:26)	hul16G7VHv7 (SEQ ID NO:27)
1	1	Fr1	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	Q	Q	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	Q	Q	V	V	V	V	Q	Q	Q	Q	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	P	S	P	S	S	S	S	S	P	S	P	P	P	S	P
8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	S	A	S	A	A	A	A	A	S	A	S	S	A	A	A
10	10	Fr1	V	E	V	E	E	E	E	E	V	E	V	V	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	L	L	V	V	V	V	L	L	L	L	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	R	K	K	K	K	K	R	K	R	R	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	V	L	L	V	V	V	V	L	L	L	L	V	V	V
21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	Fr1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

28	28	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
29	29	Fr1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
30	30	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
31	31	CDR-H1	S	G	S	S	S	G	S	G	S	S	S	S	S	S	S
32	32	CDR-H1	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
33	33	CDR-H1	W	Y	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
34	34	CDR-H1	I	M	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
35A		CDR-H1															
35B		CDR-H1															
36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	A	V	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	K	R	R	R	R	R	R	K	R	R	R	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	R	A	R	R	R	R	A	A	R	R	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W

48	48	Fr2	I	M	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	M	M	M
49	49	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	E	W	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	CDR-H2	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
52B																	
52C																	
53	54	CDR-H2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
54	55	CDR-H2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	N	G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	N	A	N	N	N	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N
61	62	CDR-	E	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

		H2														
62	63	Fr3	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
63	64	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
64	65	Fr3	K	Q	K	K	K	K	Q	K	K	K	K	K	K	K
65	66	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	K	R	K	K	R	R	R	K	K	K	R	R
67	68	Fr3	A	V	A	V	A	A	V	V	V	A	A	A	V	V
68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	L	M	L	L	L	L	L	L	L	L	L	M	M	M
70	71	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	V	R	V	V	V	V	R	R	V	V	V	V	V	V
72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	I	T	I	T	I	I	I	T	I	I	I	I	T	I
74	75	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	I	S	A	I	I	I	A	S	S	S	I	I	I
76	77	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	V	M	V	M	M	M	M	M	M	V	V	M	M	M
81	82	Fr3	D	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
82	83	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	T	S	T	T	S	S	S	S	T	T	T	S	S	S
82B	85	Fr3	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	T	T	T	T	T	T	T	T	T	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	D	E	E	D	D	D	D	E	E	E	E	D	D
86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

87	91	Fr3	S	T	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
94	98	CDR-H3	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
95	99	CDR-H3	L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
96	100	CDR-H3	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
97	101	CDR-H3	W		W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
98	102	CDR-H3	L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
99	103	CDR-H3	I		I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
100	104	CDR-H3	P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
100A	105		L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
100B																
100C																
100D																
100E																
100F																
100G																
100H																
100I																
100J																
100K																
101	106	CDR-H3	D		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
102	107	CDR-H3	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
103	108	Fr4	W		W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
104	109	Fr4	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
105	110	Fr4	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	111	Fr4	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
107	112	Fr4	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	113	Fr4	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
109	114	Fr4	L		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
110	115	Fr4	I		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
111	116	Fr4	V		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
112	117	Fr4	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	118	Fr4	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Таблица 5

Обратные мутации и другие мутации VH, VL для гуманизированного 16G7

Вариант VH или VL	Экзон акцепторной последовательности VH или VL	Изменения по сравнению с остатками акцепторного каркасного участка и CDR (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотта)
hu16G7VHv1 (SEQ ID NO:15)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33))	H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H37, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82A, H82B, H83, H85
hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33))	H1, H5, H11, H12, H20, H48, H69, H71, H75, H82A, H82B, H83, H85
hu16G7VHv2a (SEQ ID NO:17)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33))	H1, H12, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H83
16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33))	H1, H12, H31, H40, H48, H60, H66, H67, H69, H71, H73, H83
hu16G7VHv2b (SEQ ID NO:19)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33))	H1, H12, H40, H48, H69, H73, H83
hu16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO: 20)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33))	H1, H12, H31, H40, H48, H60, H64, H69, H73, H83
hu16G7VHv3 (SEQ ID NO:21)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33))	H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H48, H69, H71, H75, H82A, H82B, H83, H85
hu16G7VHv4 (SEQ ID NO:22)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33))	H1, H5, H11, H12, H20, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H82A, H82B, H83, H85
hu16G7VHv5V (SEQ ID NO:23)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33))	H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82A, H82B, H83, H85

hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 33)	H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82A, H82B, H83, H85
hu16G7VHv6a (SEQ ID NO:25)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 33)	H7, H71, H73
hu16G7VHv6b (SEQ ID NO:26)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 33)	H71
hu16G7VHv7 (SEQ ID NO:27)	Учетный код NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 33)	H1, H7, H71, H73
Hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28)	Учетный код NCBI IMGT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO:36)	L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43, L48
Hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29)	Учетный код NCBI IMGT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO:36))	L4, L9, L15, L22, L43
Hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30)	Учетный код NCBI IMGT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO:36)	L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43

Таблица 6

Нумерация Кэбота остатков каркасного участка (или CDR) (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 16G7

Остаток	(Тяжелая цепь)	16G7 мыши	hu16G7VHv1	hu16G7VHv2	hu16G7VHv2a	16G7VHv2aB7	hu16G7VHv2b	hu16G7VHv2bH7	hu16G7VHv3	hu16G7VHv4	hu16G7VHv5V	hu16G7VHv5VR	hu16G7VHv6a	hu16G7VHv6b	hu16G7VHv7
H1	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	Q	Q	E
H5	V	Q	Q	Q	V	V	V	V	Q	Q	Q	Q	V	V	V
H7	S	P	P	S	S	S	S	S	P	S	P	P	P	S	P
H9	A	S	S	A	A	A	A	A	S	A	S	S	A	A	A
H10	E	V	V	E	E	E	E	E	V	E	V	V	E	E	E
H11	V	L	L	L	V	V	V	V	L	L	L	L	V	V	V
H12	K	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	K	K	K
H13	K	R	R	K	K	K	K	K	R	K	R	R	K	K	K
H20	V	L	L	L	V	V	V	V	L	L	L	L	V	V	V
H31	G	S	S	S	S	G	S	G	S	S	S	S	S	S	S
H37	V	A	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
H38	R	K	K	R	R	R	R	R	R	R	K	R	R	R	R
H40	A	R	R	A	R	R	R	R	A	A	R	R	A	A	A
H48	M	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	M	M	M

H60	A	N	N	N	N	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N
H64	Q	K	K	K	K	K	K	Q	K	K	K	K	K	K	K
H66	R	K	K	R	K	K	R	R	R	K	K	K	R	R	R
H67	V	A	A	V	A	A	V	V	V	A	A	A	V	V	V
H69	M	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	M	M	M
H71	R	V	V	V	V	V	R	R	V	V	V	V	V	V	V
H73	T	I	I	T	I	I	I	I	T	I	I	I	I	T	I
H75	I	S	S	A	I	I	I	I	A	S	S	S	I	I	I
H80	M	V	V	M	M	M	M	M	M	M	V	V	M	M	M
H82A	S	T	T	T	S	S	S	S	T	T	T	T	S	S	S
H82B	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R
H83	R	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	R	R	R
H85	D	E	E	E	D	D	D	D	E	E	E	E	D	D	D

Таблица 7

Нумерация Кэбота каркасных остатков (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 16G7

Остаток	IMGT#IGKV4-1*01 (легкая цепь)	16G7 мышь	Hu16G7VLv1	Hu16G7VLv2	Hu16G7VLv3
L4	M	L	L	L	L
L9	D	S	S	S	S
L15	L	V	V	V	V
L18	R	K	K	R	K
L19	A	V	V	A	V
L21	I	M	M	I	M
L22	N	S	S	S	S
L43	P	S	S	S	S
L48	I	M	M	I	I

Таблица 8

Процент степени гуманизации тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител 16G7

Вариант VH или VL	% степени гуманизации
hu16G7VHv1 (SEQ ID NO:15)	64,30%
hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16)	76,50%
hu16G7VHv2a (SEQ ID NO:17)	79,60%
16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18)	81,60%
hu16G7VHv2b (SEQ ID NO:19)	82,70%
hu16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO: 20)	85,70%
hu16G7VHv3 (SEQ ID NO:21)	72,40%
hu16G7VHv4 (SEQ ID NO:22)	73,50%
hu16G7VHv5V (SEQ ID NO:23)	66,30%
hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24)	67,30%
hu16G7VHv6a (SEQ ID NO:25)	86,70%
hu16G7VHv6b (SEQ ID NO:26)	88,80%
hu16G7VHv7 (SEQ ID NO:27)	85,70%
hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28)	82,20%
hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29)	86,10%
hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30)	83,20%

Положения, в которых канонические, верньерные остатки или остатки поверхности взаимодействия отличаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами для замены. Примеры канонических/взаимодействующих с CDR остатков включают остатки согласно Кэботу H24, H26, H27, H29, H34, H52a, H55, H70, H71, H74, H94, L2, L4, L25, L27b, L33, L48, L64, L71, L90 и L95 в табл. 4. Примеры остатков поверхности взаимодействия/остатков упаковки (VH+VL) включают остатки согласно Кэботу H35, H37, H39, H45, H47, H91, H93, H95, H100a, H103, L34, L36, L38, L44, L46, L87, L89, L91, L96, L98 в табл. 3.

Основания для выбора положений, указанных в табл. 3 в вариабельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

M4L представляет собой мутацию остатка, который осуществляет контакт с LCDR1 и LCDR3. P43S представляет собой мутацию остатка, который осуществляет контакт с двумя остатками поверхности взаимодействия (Y91 и W103) в VH. I48M представляет собой мутацию остатка поверхности взаимодействия. D9S, L15V, R18K, A19V, I21M и N22S представляют собой обратные мутации на основе частоты или мутации на основе частоты/для выравнивания с зародышевой линией.

Основания для выбора положений, указанных в табл. 4 в вариабельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

Q1E представляет собой мутацию, усиливающую стабильность, для снижения потенциала образования пироглутамата (Liu, 2011, ссылка выше).

S7P представляет собой мутацию на пролин для улучшения фолдинга. R71V представляет собой мутацию остатка, который может осуществлять контакт с HCDR2 посредством водородной связи. T73I представляет собой мутацию остатка, который может осуществлять контакт с HCDR1 и HCDR2.

V5Q, E10V, V11L, K12V, K13R, V20L, S31G, V37A, R38K, A40R, M48I, N60A, K64Q, R66K, V67A, M69L, I75S, I75A, M80V, S82a-T, R83b-S, R83T и D85E представляют собой обратные мутации на основе частоты или мутации для выравнивания с зародышевой линией.

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

Дизайны на основе данных каркасных областей человека являлись следующими.

Вариабельная область каппа.

hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28):

DIVLTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLMYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTFGGGKLEIKR

hu16G7VLv2 (SEQ ID NO: 29):

DIVLTQSPSSLAVSVGERATISCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQ
KPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTF
GGGKLEIKR

hu16G7VLv3 (SEQ ID NO: 30):

DIVLTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTFGGGKLEIKR
VARIABLE HEAVY

hu16G7VHv1 (SEQ ID NO: 15):

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWAKQRPQGQLEWIGEIPNSGNTN
YNEKFKGKATLTVDISSTAYVELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVTVSS

hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16):

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWIGEIPNSGNTN
YNEKFKGRVTLTVDTASTAYMELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVTVS
S

hu16G7VHv2a (SEQ ID NO: 17):

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGQLEWIGEIPNSGNT
NYNEKFKGKATLTVDISISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVTVS
S

hu16G7VH2aB7 (SEQ ID NO: 18)

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTGSIHWVRQRPQGQLEWIGEIPNSGNT
NYAEKFKGKATLTVDISISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVTVS
S

hu16G7VHv2b (SEQ ID NO: 19):

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGQLEWIGEIPNSGNT
NYNEKFKGRVTLTRDISISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVTVS
S

hu16G7VH2bH7 (SEQ ID NO: 20)

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTGSIHWVRQRPQGQLEWIGEYIPNSGNT
 NYAEKFQGRVTLTRDISISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITVTVS
 S

hu16G7VHv3 (SEQ ID NO: 21):

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWIGEYIPNSGNTN
 YNEKFKGRVTLTVDTASTAYMELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITVTVS
 S

hu16G7VHv4 (SEQ ID NO: 22):

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWIGEYIPNSGNTN
 YNEKFKGKATLTVDISSSTAYMELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITVTVS

hu16G7VHv5V (SEQ ID NO: 23):

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGQLEWIGEYIPNSGNTN
 YNEKFKGKATLTVDISSSTAYVELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITVTVS

hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO: 24):

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGQLEWIGEYIPNSGNTN
 YNEKFKGKATLTVDISSSTAYVELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITVTVS

hu16G7VHv6a (SEQ ID NO: 25):

QVQLVQPGAIEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWMGEIYPNSGN
 TNYNEKFKGRVTMTVDISISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITV
 VSS

hu16G7VHv6b (SEQ ID NO: 26):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWMGEIYPNSGN
 TNYNEKFKGRVTMTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITV
 VSS

hu16G7VHv7 (SEQ ID NO: 27):

EVQLVQPGAIEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWMGEIYPNSGN
 TNYNEKFKGRVTMTVDISISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITV
 VSS

Пример 4. 16G7 иммунным способом захватывает тау из пораженной болезнью Альцгеймера ткани человека.

Способы.

На фиг. 4А показана ткань коры головного мозга височной области от головного мозга, пораженного болезнью Альцгеймера, которую использовали для экстракции фракций белка с различной растворимостью. Замороженную ткань гомогенизировали в 5 объемах буфера для повторной сборки (reassembly buffer, RAB) (100 mM MES, 1 mM EGTA, 0,5 mM MgSO₄, 750 mM NaCl, pH 6,8) и центрифугировали для получения растворимой в RAB фракции. Затем осадок гомогенизировали в 5 объемах буфера для анализа методом радиоиммунопреципитации (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, pH 7,5) и центрифугировали для получения растворимой в RIPA фракции. Данный осадок гомогенизировали в 5 объемах саркозильного буфера (25 mM Tris, 1 mM EGTA, 1% саркозил, 10% сахара, 1 mM DTT, 500 mM NaCl, pH 7,5) и центрифугировали для получения растворимой в саркозильной фракции. Данный итоговый не растворимый в саркозильной осадок гомогенизировали в 2% SDS. Образцы готовили в восстанавливающем/денатурирующем буфере для образцов и проводили их разделение методом ПААГ-ДСН (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия). Проводили вестернблоттинг с применением антитела 16G7 мыши.

На фиг. 4В показаны растворимые в RAB фракции белка, которые готовили в концентрации 1 мг/мл. Для каждой иммунопреципитации использовали 300 мкг образца. 10 мкг указанного антитела (изотипический контроль, 16G7 или антитело 16B5 против тау) добавляли к препаратам образца, растворимым в RAB, и инкубировали в течение 2 ч. Затем к смесям добавляли магнитные бусины с белком G и инкубировали еще в течение 1 ч для захвата комплексов антитело/антиген. Образцы тщательно промывали 1× ФБР и бусины кипятили в восстанавливающем/денатурирующем буфере для образца для высвобождения захваченных белков. Полученные в результате образцы разделяли методом ПААГ-ДСН и проводили вестернблоттинг с применением поликлонального антитела против тау (Dako, № A0024).

Результаты.

На фиг. 4А 16G7 распознает растворимый и не растворимый в саркозиле тау из ткани человека, пораженной болезнью Альцгеймера. Фракции белка с различной растворимостью разделяли методом ПААГ-ДСН и проводили блоттинг с 16G7. Множество изоформ тау наблюдаются в растворимых и нерастворимых фракциях, и в нерастворимых фракциях был обнаружен сдвиг электрофоретической подвижности, указывающий на патологическую форму тау. Во фракции, нерастворимой в саркозиле, наблюдается заметное накопление тау. Слева: маркеры молекулярной массы. Обозначения дорожек: 1 - растворимый в RAB, 2 - растворимый в RIPA, 3 - растворимый в саркозиле, 4 - не растворимый в саркозиле.

На фиг. 4В 16G7 иммунопреципитировал тау из ткани, пораженной заболеванием Альцгеймера. Растворимые в RAB фракции образовывали иммунопреципитат с указанным антителом, и их обнаруживали с помощью поликлонального антитела против тау, направленного против отдельной области молекулы тау из связывающих сайтов для 16G7 и антитела 16B5 против тау. 16G7 надежно захватывает тау из данной фракции. Образцы на входе (растворимый в RAB образец) представлены справа.

Пример 5. Реактивность в отношении ткани человека, пораженной болезнью Альцгеймера (иммуногистохимический анализ).

Кору головного мозга лобно-височной области получали от пациентов, не страдающих от нейродегенеративного заболевания или страдающих от болезни Альцгеймера, что подтверждали в ходе посмертной оценки. Иммуногистохимическое исследование проводили на слегка фиксированных ацетоном криосрезах толщиной 10 мкм, закрепленных на стекле. Все этапы окрашивания проводили с помощью автоматического устройства для окрашивания Leica BOND Rx с применением расходных материалов Leica. Формы 16G7 мыши или человека инкубировали со срезами ткани с последующим добавлением соответствующих виду вторичных антител, конъюгированных с полимером ПХ. Для предотвращения неспецифического связывания эндогенных иммуноглобулинов при применении гуманизированных антител на ткани человека антитела перед инкубацией с тканью нековалентно метили конъюгированным с биотином моновалентным Fab-фрагментом против иммуноглобулинов человека *in vitro*. Ткань, меченную комплексом первичное антитело - Fab-фрагмент с биотином, затем амплифицировали с применением системы амплификации авидин-биотин (Vector Laboratories, Бурлингем, Калифорния). Окрашивание визуализировали с помощью хромогена DAB, который вызывал образование осадка коричневого цвета. Отрицательный контроль заключался в осуществлении всей иммуногистохимической процедуры на прилежащих срезах с антителом IgG изотипического контроля.

Исследуемые антитела представляли собой 16G7 мыши, химерное 16G7 (которое содержало VH и VL из антитела мыши с константными областями человека, тяжелую цепь SEQ ID NO: 54 и легкую цепь SEQ ID NO: 55) и гуманизированные варианты 16G7 hu16G7VHv7/hu16G7VLv2 и hu16G7VHv2bH7/hu16G7VLv2.

Окрашивание, которое проводили с антителом 16G7 мыши, химерным 16G7 и гуманизированными формами 16G7 (hu16G7VHv7/hu16G7VLv2 и hu16G7VHv2bH7/hu16G7VLv2), качественно сравнивали и оценивали в отношении устойчивости и интенсивности окрашивания, а также локализации иммунореактивности. Интенсивность окрашивания была аналогичной для химерной и гуманизированной форм 16G7 и демонстрировала аналогичный характер локализации по сравнению с формой антитела мыши. Тау был обнаружен в нейрофибриллярных клубках, волокнах, нитях нейропилей и в дегенерирующих аксонах. Также наблюдалось заметное соматическое окрашивание.

Пример 6. Активность дезагрегации.

Способы.

Агрегация рекомбинантного тау. Очищенный рекомбинантный тау с N-концевой меткой 6xHis сочетали с эквимоллярными количествами низкомолекулярного гепарина в 1× ФБР (pH 7,4) и инкубировали при температуре 37°C в течение 96 ч на шейкере-качалке. Агрегацию образца подтверждали посредством связывания с тиюфлавином Т.

Инкубация с антителами. Антитела инкубировали с агрегированным рекомбинантным тау в указанных молярных соотношениях, инкубировали при температуре 37°C в течение 96 ч без вращения или покачивания. По окончании эксперимента измеряли агрегацию посредством инкубации образцов с 25 мМ тиюфлавином Т и измерения испускаемой флуоресценции (возбуждение/испускание 450/482). Из сигналов вычитали фон образцов буфера.

Результаты.

Как показано на фиг. 5, 16G7 предпочтительно деассемблирует интактные волокна тау. Варьирующие молярные соотношения 16G7 (треугольники), изотипический контроль (круги) и антитело 16B5 против тау (квадраты) инкубировали с амилоид-содержащими волокнами тау в течение 96 ч. По окончании данного периода времени оценивали степень агрегации посредством связывания с тιοфлавином Т. 16G7 предпочтительно снижает сигнал тιοфлавина Т, присутствующий в образце, по сравнению как с антителом изотипического контроля, так и с антителом 16B5 против тау, которое связывается с отличной областью тау.

Пример 7. Аффинность антитела 16G7 мыши в отношении тау.

Анализ методом ПНР (поверхностного плазмонного резонанса) проводили с применением прибора Biacore T200 для определения кинетики связывания 16G7 с рекомбинантным тау человека. Для подготовки поверхности сенсора антитело против иммуноглобулинов мыши (GE Life Sciences) иммобилизовали на сенсорный датчик CM5 посредством аминного сочетания и 16G7 захватывали на уровне, который обеспечивал максимальное связывание 50 Е.О. (единиц ответа). Над захваченным лигандом пропускали различные концентрации рекомбинантного тау, варьирующие от 10-0,14 нМ, при скорости потока 50 мкл/мин в буфере для анализа (HBS+0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в течение 180 с ассоциации и 900 с диссоциации. Данные соотносили дважды как к нерелевантному сенсору, не содержащему лиганд антитела, так и к концентрации анализата 0 нМ для учета диссоциации лиганда от захватывающей молекулы. Затем данные анализировали с применением глобальной подгонки 1:1. Кинетика связывания представлена на фиг. 6.

Пример 8. Аффинность химерного антитела 16G7 и гуманизированных вариантов в отношении тау.

Анализ методом ППР проводили с применением прибора Biacore T200 для определения кинетики связывания 16G7 с рекомбинантным тау человека. Для подготовки поверхности сенсора на сенсорный датчик CM5 иммобилизовали антитело против иммуноглобулинов человека (GE Life Sciences) посредством аминного сочетания и химерные или гуманизированные антитела захватывали на уровне, который обеспечивает максимальное связывание 50 Е.О. Над захваченными лигандами пропускали различные концентрации рекомбинантного тау, варьирующие от 10-0,14 нМ, параллельно при скорости потока 50 мкл/мин в буфере для анализа (HBS+0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в течение 180 с для ассоциации и 900 с для диссоциации. Данные соотносили дважды как к нерелевантному сенсору, не содержащему лиганд антитела, так и к концентрации анализата 0 нМ для учета диссоциации лиганда от захватывающей молекулы. Затем данные анализировали с применением глобальной подгонки 1:1.

Исследуемые антитела представляли собой химерное 16G7 (содержащее области VH и VL от антитела мыши с константными областями человека, тяжелую цепь SEQ ID NO: 54, легкую цепь SEQ ID NO: 55) и гуманизированные варианты (hu16G7VHv2a/hu16G7VLv2, hu16G7VHv2b/hu16G7VLv2 и hu16G7VHv7/hu16G7VLv2).

На фиг. 7 аффинность исследуемых антител определяли посредством анализа методом ППР. Варьирующие концентрации рекомбинантного тау пропускали над иммобилизованным антителом и полученные в результате сенсограммы анализировали с применением глобальной подгонки 1:1. Кинетика аффинности, скорость ассоциации и диссоциации представлены на фиг. 7.

Пример 9. Авидность в отношении агрегированного тау.

Способы.

Получение Fab-фрагментов. Fab-фрагменты 16G7 получали с применением набора Fab Micro Preparation согласно указаниям производителя (Pierce). Удаление высвободившегося Fc и подтверждение интактного конечного продукта контролировали методом ПААГ-ДСН и концентрацию определяли с применением метода с бидинхоиновой кислотой (Pierce).

Агрегация рекомбинантного тау. Очищенный рекомбинантный тау с N-концевой меткой 6xHis сочетали с эквимольными количествами низкомолекулярного гепарина в 1× ФБР (pH 7,4) и инкубировали при температуре 37°C в течение 96 ч на шейкере-качалке. Агрегацию образца подтверждали посредством связывания с тιοфлавином Т.

Анализ Fab-фрагментов и интактного антитела методом ППР. Сравнительные исследования связывания Fab-фрагментов и интактных антител проводили на приборе Biacore T200. Для подготовки поверхности сенсора антитела против His (GE Life Sciences) иммобилизовали на сенсорный датчик CM3 посредством аминного сочетания и агрегированный рекомбинантный тау (приготовленный, как описано выше) пропускали над исследуемым каналом, который выступал в качестве лиганда анализа. 16G7 (интактное антитело или Fab-фрагменты) пропускали над захваченным агрегированным тау при скорости потока 50 мкл/мин в буфере для анализа (FIBS+0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в режиме одного цикла, в концентрациях, варьирующих от 10-0,016 нМ, в течение фаз ассоциации длительностью 180 с и итоговой фазы диссоциации длительностью 900 с. Кривые ассоциации/диссоциации соотносили дважды с вычитанием как данных нерелевантного сенсора, не содержащего лиганд антитела, так и концентрации анализата 0 нМ для учета диссоциации лиганда от захватывающей молекулы.

Результаты.

Авидность является показателем множества аффинностей взаимодействия антиген-антитело и бо-

лее точно представляет функциональную аффинность антитела в отношении иммобилизованного антигена, такого как агрегаты или нейрофибрилярные клубки, состоящие из тау. В измерениях методом ППР разницу между аффинностью (единичное взаимодействие) и авидностью (множество взаимодействий) получают посредством сравнения кинетики связывания Fab-фрагмента, содержащего один связывающий домен, и интактного антитела с двумя связывающими доменами.

На фиг. 8 измерения связывания Fab-фрагментов 16G7 сравнивали с интактным антителом. Фазы ассоциации (сплошные горизонтальные линии) и диссоциации (пунктирные горизонтальные линии) представлены в виде диаграмм. Различие между аффинностью единичного сайта связывания и авидностью двух сайтов связывания является наиболее очевидным на итоговой фазе диссоциации, начиная с 1300 с. Видимая диссоциация комплекса антиген/антитело для интактного антитела отсутствует, тогда как Fab-фрагменты определенно диссоциируют от агрегированного тау.

Перечень последовательностей

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDE
AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAK
TPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPTREPCKVAVVRTPPKSP
SSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD
NIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKI
GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSSST
GSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKG
ADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPG
TPGSRRTPSLPTPTREPCKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKSIGSTEN
LKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGS
LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
AKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

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

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEAGIGDTPSLE
DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIP
AKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPTREPCKVAVVRTPPK
SPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS
KDNKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQ
SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNV
SSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDE
AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAK
TPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPTREPCKVAVVRTPPKSP
SSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLG

NIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK
TDHGAEIVYKSPVVSOGDTSPRHL SNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKG
ADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRI PAKTPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPG
TPGSRRTPSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKIGSTEN
LKHQPGGGKVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKI
GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSOGDTSPRHL SNVSST
GSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEAGIGDTPSLE
DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRI P
AKTPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPTREP KKVAVVRTPPK
SPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYK PVDLSKVT SKCGS
LGNIIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
AKTDHGAEIVYKSPVVSOGDTSPRHL SNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

SEQ ID NO: 7; последовательность белка VH:

QVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWAKRPGQGLEWIGEIYPNSGNTN
YNEKFKGKATLTVDISSTAYVDLTSLTSEDSAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTLIVSS

SEQ ID NO: 8; HCDR1 мыши:

GYTFTSSWIH

SEQ ID NO: 9; HCDR2 мыши:

EIYPNSGNTNYNEKFKG

SEQ ID NO: 10; HCDR3 мыши:

LGWLIPLDY

SEQ ID NO: 11; последовательность белка VL мыши:

DIVLSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLMYWAS
TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLKAEDLAVYYCQQFYDYPWTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO: 12; LCDR1 мыши:

KSSQSLLDGNDQKNYLA

SEQ ID NO: 13; LCDR2 мыши:

WASTRES

SEQ ID NO: 14; LCDR3 мыши:

QQFYDYPWT

SEQ ID NO:15; >hu16G7VHv1

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWAKQRPQGQLEWIGEIYPNSGNTN
YNEKFKGKATLTVDISSTAYVELTSLTSEDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:16; > hu16G7VHv2

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWIGEIYPNSGNTN
YNEKFKGRVTLTVDTASTAYMELTSLTSEDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITVTVS
S

SEQ ID NO:17; > hu16G7VHv2a

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGQLEWIGEIYPNSGNT
NYNEKFKGKATLTVDISISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITVTVS
S

SEQ ID NO:18; > hu16G7VHv2aB7

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTGSIHWVRQRPQGQLEWIGEIYPNSGNT
NYAEKFKGKATLTVDISISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITVTVS
S

SEQ ID NO:19; > hu16G7VHv2b

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGQLEWIGEIYPNSGNT
NYNEKFKGRVTLTRDISISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITVTVS
S

SEQ ID NO:20; > hu16G7VHv2bH7

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTGSIHWVRQRPQGQLEWIGEIYPNSGNT
NYAEKFQGRVTLTRDISISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTITVTVS
S

SEQ ID NO:21; > hu16G7VHv3

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWIGEIPNSGNTN
YNEKFKGRVTLTVDTSASTAYMELTSLSLSEDVAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVTVSS
S

SEQ ID NO: 22; > hu16G7VHv4

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWIGEIPNSGNTN
YNEKFKGKATLTVDISSSTAYMELTSLSLSEDVAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:23; > hu16G7VHv5V

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVKQRPQGQLEWIGEIPNSGNTN
YNEKFKGKATLTVDISSSTAYVELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:24; > hu16G7VHv5VR

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGQLEWIGEIPNSGNTN
YNEKFKGKATLTVDISSSTAYVELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 25; > hu16G7VHv6a

QVQLVQPGAIEVKKPGASVKVSKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWMGEIYPNSGN
TNYNEKFKGRVTMTVDISISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVT
VSS

SEQ ID NO:26; > hu16G7VHv6b

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWMGEIYPNSGN
TNYNEKFKGRVTMTVDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVT
VSS

SEQ ID NO:27; > hu16G7VHv7

EVQLVQPGAIEVKKPGASVKVSKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGQLEWMGEIYPNSGN
TNYNEKFKGRVTMTVDISISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTVT
VSS

SEQ ID NO: 28; > hu16G7VLv1

DIVLTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLMYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO: 29; > hu16G7VLv2

DIVLTQSPSSLAVSVGERATISCKSSQSLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:30; > hu16G7VLv3

DIVLTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO: 31; акцептор VH человека AAA18265.1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYMHWRQAPGRGLEWMGRINPNSG
GTNYAQKFQGRVTMTRDTSIRTAYVELSRLTSDDTAVYYCASLADDDPEDFWGQGTLV
TVSS

SEQ ID NO: 32; акцептор VH человека ADW08092.1

QVQLVESGAIEVKKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPQRLEWMGEINPDNG
HTNYNEKFKSRVTITVDKSASTAYMELSSRLSEDTAVYYCAREADYSYGAFDIWGP GTT
TVTVSS

SEQ ID NO: 33; акцептор VH человека IMGT#IGHV1-2*02

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSG
GTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC

SEQ ID NO: 34; акцептор VL человека AAB24404.1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPPMFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 35; акцептор VL человека AEK69364.1

DIVLTQSPDSLAVSLGERATIKCKSSQSVLYGSDSKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLQAADVAVYYCQEYYSSLCTFGQGTKLEIKR

SEQ ID NO: 36; акцептор VL человека IMGT#IGKV4-1*01

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTP

SEQ ID NO: 37; нуклеотидная последовательность VH мыши:

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGTCTGTGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAA
GCTGTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTCCTGGATACACTGGGCGAA
GCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTATCCTAATAGTGGTA
ATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACATATCC
TCCAGCACAGCCTACGTGGATCTCACCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTAT
TATTGTGCAAGATTGGGATGGTTAATACCCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACT
CTCATAGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 38; нуклеотидная последовательность VL мыши:

GACATTGTGCTGTACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTGAGTGGAGAGAAGGTT
ACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAGATGGTAATGATCAAAAGAACTA
CTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGATGTACTGGGC
ATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAG
ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTTTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTC
AGCAGTTTTATGACTATCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
CGT

SEQ ID NO: 39; CDR-H1 согласно Кэботу

SSWIH

SEQ ID NO: 40; CDR-H1 согласно Чотиа

GYTFTSS

SEQ ID NO: 41; CDR-H2 согласно Чотиа

YPNSGN

SEQ ID NO: 42; CDR-H2 согласно AbM

EIYPNSGNTN

SEQ ID NO: 43; CDR-L1 согласно контактному определению

KNYLAWY

SEQ ID NO: 44; CDR-L2 согласно контактному определению

LLMYWASTRE

SEQ ID NO: 45; CDR-L3 согласно контактному определению

QQFYDYPW

SEQ ID NO: 46; CDR-H1 согласно контактному определению

TSSWIH

SEQ ID NO: 47; CDR-H2 согласно контактному определению

WIGEIYPNSGNTN

SEQ ID NO: 48; CDR-H3 согласно контактному определению

ARLGWLIPLD

SEQ ID NO: 49; Альтернативный CDR-H1

GYTFTGSIH

SEQ ID NO: 50; Альтернативный CDR-H2

EIYPNSGNTNYAEKFKG

SEQ ID NO: 51; Альтернативный CDR-H2

EIYPNSGNTNYAEKFQG

SEQ ID NO: 52; консенсусная аминокислотная последовательность переменных об-

ластей тяжелой цепи антитела 16G7 мыши и гуманизированных антител 16G7 (обозначена "Большинство" на фиг. 2)

EVQLXQXGAEXVKPGASVKXSCKASGYFTFTSSWIHWVRQRPQGGLWIGEIYPNSGNT
 NYNEKFKGXXTLTVDISISTAYMELXXLTSXDTAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTTVTV
 SS

SEQ ID NO: 53; консенсусная аминокислотная последовательность сре-
 ди вариабельных областей легкой цепи антитела 16G7 мыши и гуманизи-
 рованных антител 16G7 (обозначена "Большинство" на фиг. 3)

DIVLTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLDGNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLXYWAS
 TRESGVPDRFSGSGSGTDFLTITSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO: 54; тяжелая цепь химерного антитела 16G7
 QVQLQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYFTFTSSWIHWAKQRPQGGLWIGEIYPNSGNTN
 YNEKFKGKATLTVDISSSTAYVDLTSLTSEDSAVYYCARLGWLIPLDYWGQGTTLIVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 55; легкая цепь химерного антитела 16G7
 DIVLSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLDGNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLMYWAS
 TRESGVPDRFTGSGSGTDFLTITSLKAEDLAVYYCQQFYDYPWTFGGGKLEIKRKT
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с тау-белком человека, содержащее три CDR тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 7, и три CDR легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 11, при условии, что положение 31 тяжелой цепи занимает S или G, положение 60 тяжелой цепи занимает N или A и положение 64 тяжелой цепи занимает K или Q, где положения пронумерованы согласно определению Кэбота.

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что указанные три CDR тяжелой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 8, 9 и 10), и указанные три CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 12, 13 и 14).

3. Антитело по п.1, которое представляет собой мышинное, химерное, венированное или гуманизи-
 рованное антитело.

4. Антитело по п.3, отличающееся тем, что указанное антитело является гуманизированным и со-
 держит гуманизованную зрелую вариабельную область тяжелой цепи и гуманизованную зрелую
 вариабельную область легкой цепи.

5. Антитело по п.4, отличающееся тем, что указанные три CDR тяжелой цепи являются такими, как
 определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 8, 9 и 10), и указанные три
 CDR легкой цепи являются такими, как определено согласно сводному определению Кэбота/Чотиа
 (SEQ ID NO: 12, 13 и 14), при условии, что положение 31 тяжелой цепи занимает S или G, положение 60
 тяжелой цепи занимает N или A и положение 64 тяжелой цепи занимает K или Q, где положения прону-
 мерованы согласно определению Кэбота.

6. Антитело по п.5, отличающееся тем, что CDR-H1 содержит аминокислотную последователь-
 ность, содержащую SEQ ID NO: 49, CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, содержа-
 щую SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 51.

7. Антитело по п.4, которое является гуманизированным, в котором указанные CDR соответствуют
 определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно определению Кэбота, Чотиа,
 сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения.

8. Антитело по п.7, которое является гуманизированным, в котором указанная гуманизированная
 зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи согласно сводному опреде-
 лению Кэбота/Чотиа, как указано в SEQ ID NO: 8-10, и указанная гуманизированная зрелая вариабельная
 область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи согласно сводному определению Кэбота/Чотиа, как
 указано в SEQ ID NO: 12-14.

9. Антитело по п.7, которое является гуманизированным, в котором указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи согласно определению Кэбота, как указано в SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи согласно определению Кэбота, как указано в SEQ ID NO: 12-14.

10. Антитело по п.7, которое является гуманизированным, в котором указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи согласно определению Чотиа, как указано в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 10, и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи согласно определению Чотиа, как указано в SEQ ID NO: 12-14.

11. Антитело по п.7, которое является гуманизированным, в котором указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи согласно определению AbM, как указано в SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 10, и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи согласно определению AbM, как указано в SEQ ID NO: 12-14.

12. Антитело по п.7, которое является гуманизированным, в котором указанная гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи согласно контактному определению, как указано в SEQ ID NO: 46-48, и указанная гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи согласно контактному определению, как указано в SEQ ID NO: 43-45.

13. Антитело по любому из пп.7-12, которое является гуманизированным, содержащее гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 15-27, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 28-30.

14. Антитело по п.13, которое является гуманизированным, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 15-27, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 28-30.

15. Антитело по п.14, которое является гуманизированным, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 15-27, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 28-30.

16. Антитело по п.15, которое является гуманизированным, в котором указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 15-27 и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 28-30.

17. Антитело по п.16, которое является гуманизированным, в котором указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 29.

18. Антитело по п.16, которое является гуманизированным, в котором указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 29.

19. Антитело по п.16, которое является гуманизированным, в котором указанная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и указанная зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 29.

20. Антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-19, который связывается с таубелком человека.

21. Антитело по любому из пп.1-19, отличающееся тем, что указанное антитело имеет изотип IgG1 человека.

22. Антитело по любому из пп.4-19 и 21, которое является гуманизированным, в котором указанная зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи и указанная зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи.

23. Антитело по п.22, которое является гуманизированным, в котором указанная константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области тяжелой цепи человека, которая характеризуется пониженным связыванием с рецептором Fcγ по сравнению с природной константной областью тяжелой цепи человека.

24. Антитело по п.22 или 23, которое является гуманизированным, в котором указанная константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1.

25. Антитело по п.22, которое содержит по меньшей мере одну мутацию в константной области, в котором указанная мутация снижает фиксацию или активацию комплемента константной областью, где мутация находится в одном или более из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 и 331 согласно нумерации EU.

26. Антитело по любому из пп.1-19, отличающееся тем, что указанное антитело относится к изотипам IgG2 или IgG4 человека.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, как определено в любом из пп.1-19, 21-26, или антигенсвязывающий фрагмент, как определено в п.20, и фармацевтически приемлемый носитель.

28. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь антитела, как определено в любом из пп.1-19, 21-26, или антигенсвязывающего фрагмента, как определено в п.20.

29. Нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь антитела, как определено в любом из пп.1-19, 21-26, или антигенсвязывающего фрагмента, как определено в п.20.

30. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и легкую цепь антитела, как определено в любом из пп.1-19, 21-26, или антигенсвязывающего фрагмента, как определено в п.20.

31. Рекombинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.28-30.

32. Клетка-хозяин, трансформированная рекombинантным вектором экспрессии по п.31.

33. Способ гуманизации антитела мыши по п.3, причем указанный способ включает

(a) отбор одной или нескольких последовательностей акцепторных антител;

(b) идентификацию остатков аминокислот антитела мыши, которые следует сохранить;

(c) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и

(d) экспрессию указанных нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизированного антитела,

причем указанное антитело мыши содержит зрелую вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 7, и зрелую вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 11.

34. Способ получения гуманизированного, химерного или венеризованного антитела по п.3, причем указанный способ включает

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

(b) очистку указанного антитела из культуральной клеточной среды.

35. Способ получения клеточной линии, продуцирующей гуманизированное, химерное или венеризованное антитело по п.3, причем указанный способ включает

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

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

(c) выделение отдельных клеток из отобранных клеток; и

(d) создание линии клеток, клонированных из отдельной клетки, выбранной на основании выхода антитела.

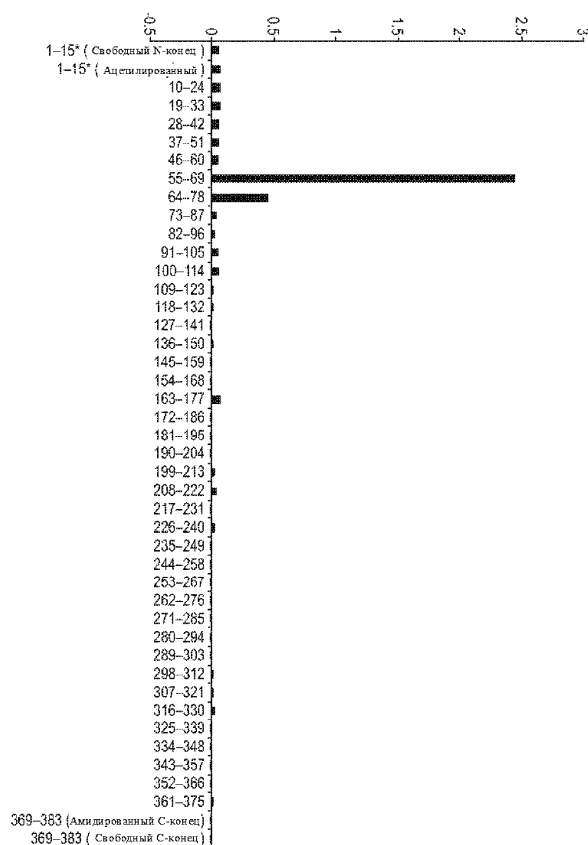
36. Способ ингибирования или снижения агрегации тау-белка у субъекта, который страдает от опосредованного тау-белком амилоидоза или подвержен риску развития опосредованного тау-белком амилоидоза, причем указанный способ включает введение указанному субъекту антитела, как определено в любом из пп.1-19, 21-26, или антигенсвязывающего фрагмента по п.20 и посредством этого ингибирование или снижение агрегации тау-белка у указанного субъекта.

37. Способ лечения или осуществления профилактики вызванного тау-белком заболевания у субъекта, причем указанный способ включает введение антитела, как определено в любом из пп.1-19, 21-26, или антигенсвязывающего фрагмента по п.20 и посредством этого лечение или осуществление профилактики указанного заболевания.

38. Способ по п.37, отличающийся тем, что указанное вызванное тау-белком заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичную возрастную таупатию, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическую деменцию или деменцию боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа C, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь аргирофильных зерен, глобулярную глиальную таупатию, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальную дегенерацию (КБД), деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

39. Способ обнаружения отложений тау-белка у субъекта, страдающего от или подверженного риску развития заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау-белка, причем указанный способ включает введение указанному субъекту антитела, как определено в любом из пп.1-19, 21-26, или антигенсвязывающего фрагмента по п.20 и обнаружение антитела, связавшегося с тау-белком, у указанного субъекта.

40. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанное заболевание, связанное с агрегацией или накоплением тау-белка, представляет собой болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичную возрастную таупатию, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическую деменцию или деменцию боксеров, болезнь Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь аргирофильных зерен, глобулярную глиальную таупатию, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортикобазальную дегенерацию (КБД), деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).



Фиг. 1.

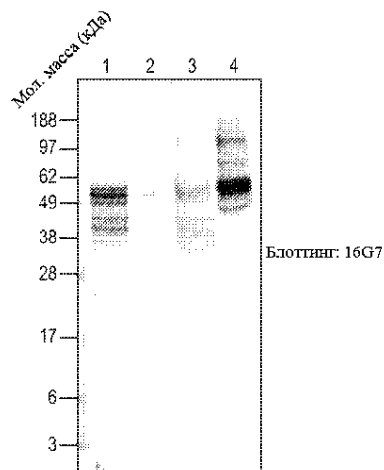
Выравнивания VH 16G7		мышь/гуманизированного 16G7	
Большинство		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	
		10 20 30 40 50 60	
Белок hu16G7VHv1		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок hu16G7VHv2		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок h16G7VHv2a		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок h16G7VHv2aB7		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок h16G7VHv2b		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок h16G7VHv2bH7		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок h16G7VHv3		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок h16G7VHv4		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок h16G7VHv5V		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок h16G7VHv5VR		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок h16G7VHv6a		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок h16G7VHv6b		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Белок h16G7VHv7		EVQLKQKGAELVKPGASVKKSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLRWIGEIYPNSGNTNY	60
Большинство		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	SEQ ID NO: 52
		70 80 90 100 110	
Белок hu16G7VHv1		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 7
Белок hu16G7VHv2		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 15
Белок h16G7VHv2a		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 16
Белок h16G7VHv2aB7		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 17
Белок h16G7VHv2b		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 18
Белок h16G7VHv2bH7		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 19
Белок h16G7VHv3		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 20
Белок h16G7VHv4		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 21
Белок h16G7VHv5V		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 22
Белок h16G7VHv5VR		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 23
Белок h16G7VHv6a		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 24
Белок h16G7VHv6b		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 25
Белок h16G7VHv7		NEKFKGKVELCVDISISDAYNELSLTSDTAVYYCARLGWLIPLDYNGQETTIVVSS	118 SEQ ID NO: 26

Фиг. 2

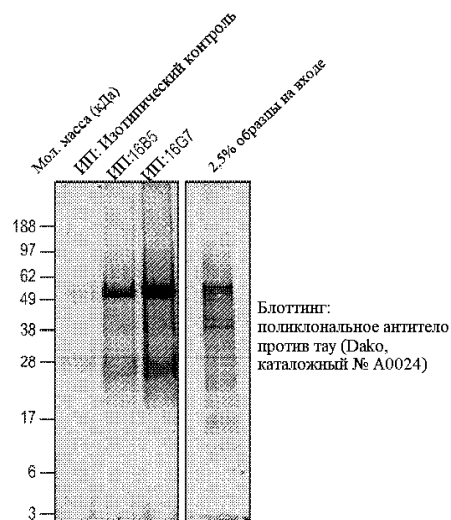
Выравнивания VL 16G7 мыши/гуманизированного 16G7

Анализ	Большинство	Белок VL 16G7	Белок h16G7VLv1	Белок hu16G7VLv2	Белок hu16G7VLv3
Анализ	DIVLTQSPSSSLAVSVGKEIVTMSCKSSQSLLDGNDQKKNYLAWYQQRPGQSPKLLXVWA	DIVLTQSPSSSLAVSVGKEIVTMSCKSSQSLLDGNDQKKNYLAWYQQRPGQSPKLLXVWA	DIVLTQSPSSSLAVSVGKEIVTMSCKSSQSLLDGNDQKKNYLAWYQQRPGQSPKLLXVWA	DIVLTQSPSSSLAVSVGKEIVTMSCKSSQSLLDGNDQKKNYLAWYQQRPGQSPKLLXVWA	DIVLTQSPSSSLAVSVGKEIVTMSCKSSQSLLDGNDQKKNYLAWYQQRPGQSPKLLXVWA
Большинство	10 20 30 40 50				
Белок VL 16G7		57			
Белок h16G7VLv1			57		
Белок hu16G7VLv2				57	
Белок hu16G7VLv3					57
Большинство	STRESGVDFRFGSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPIWTFGGGSKLEIKR	STRESGVDFRFGSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPIWTFGGGSKLEIKR	STRESGVDFRFGSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPIWTFGGGSKLEIKR	STRESGVDFRFGSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPIWTFGGGSKLEIKR	STRESGVDFRFGSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPIWTFGGGSKLEIKR
Большинство	60 70 80 90 100 110				
Белок VL 16G7		114			
Белок h16G7VLv1			114		
Белок hu16G7VLv2				114	
Белок hu16G7VLv3					114
Большинство	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30

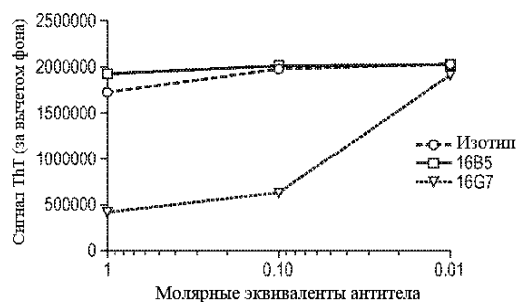
ФИГ. 3



ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



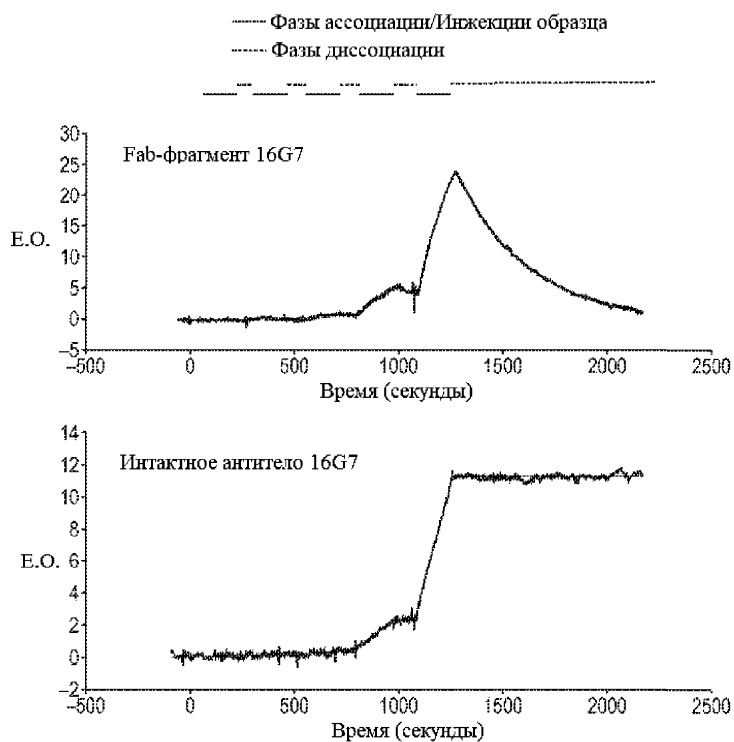
ФИГ. 5

16G7	$K_{\text{ассоц.}}$	$K_{\text{диссоц.}}$	K_d
Тау человека	1.64E6	5.63E-4	3.42E-10

Фиг. 6

Название	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
hu16G7VHv2a /hu16G7VLv2	3×10^6	8.33×10^{-4}	277
hu16G7VHv2b/hu16G7VLv2	3.52×10^6	1.07×10^{-3}	303
hu16G7VHv7/hu16G7VLv2	4.89×10^6	1.43×10^{-3}	293
Химерное	2.9×10^6	5.4×10^{-4}	187

Фиг. 7



Фиг. 8

