

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 045249

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.07

(21) Номер заявки
201992598

(22) Дата подачи заявки
2018.05.02

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

(54) АНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ ТАУ

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

(32) 2017.05.02; 2017.11.01

(33) US

(43) 2020.03.10

(86) PCT/US2018/030739

(87) WO 2018/204546 2018.11.08

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

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

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

(56) US-A1-20160031976
US-A1-20120288507
US-A1-20150050270
US-A1-20110206702
US-A1-20110053264
US-A1-20120100152
US-A1-20120301473
US-A1-20130295021

(57) Изобретение относится к области лечения, профилактики и диагностики связанного с тау заболевания. Предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с тау человека, или его связывающий фрагмент, содержащее вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 17, 12 и 13, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 14, 15 и 16; а также варианты этого антитела, их применение, фармацевтическая композиция, содержащая указанные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие их, способ гуманизации антитела мыши и способ обнаружения отложений тау-белка у субъекта. Антитела ингибируют или отсрочивают связанные с тау патологии и связанные ухудшения симптомов.

B1

045249

045249

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

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

Ссылка на перечень последовательностей

Перечень последовательностей, записанный в файле 508111SEQLIST.txt, составляет 107 килобайт, был создан 2 мая 2018 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. U.S.A. 85:4051-4055(1988); Goedert, EMBO J. 8:393-399(1989); Lee, Neuron 2:1615-1624(1989); Goedert, Neuron 3:519-526(1989); Andreadis, Biochemistry 31:10626-10633(1992)). Сообщалось, что тау играет роль в стабилизации микротрубочек, в частности, в центральной нервной системе. Суммарный тау (с-тау, т.е. фосфорилированная и нефосфорилированная формы) и фосфо-тау (ф-тау, т.е. фосфорилированный тау) высвобождается головным мозгом в ответ на нейрональное повреждение и нейродегенерацию, и, как сообщалось, повышенные уровни тау наблюдаются в СМЖ (спинномозговой жидкости) пациентов, страдающих от болезни Альцгеймера, по сравнению с общей популяцией (Jack et al., Lancet Neurol 9: 119-28 (2010)).

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 заявленного изобретения

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

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

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

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

В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения. В некоторых антителах гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 5G8 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 11-13), и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 5G8 согласно

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

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

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

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

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

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

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

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

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота,

некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

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

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

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

В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения. В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 65-67), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 68-70). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 68-70). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 67), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 68-70). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно AbM (SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 67), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно AbM (SEQ ID NO: 68-70). В некоторых антителах гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6A10 согласно контактному определению (SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6A10 согласно контактному определению (SEQ ID NO: 78-80).

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

В некоторых антителах положение H48 в области VH занимает I.

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

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

В некоторых антителах L46 в области VL занимает L.

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

В некоторых антителах положение L46 в области VL занимает L. В некоторых антителах положе-

ния L12, L17 и L46 в области VL занимает S, E и L, соответственно..

Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 85-87, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 88-90. Некоторые антитела содержат зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 85-87, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 88-90.

В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85-87, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 88-90.

В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

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

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

Некоторые антитела представляют собой гуманизированные антитела. Некоторые антитела представляют собой гуманизованное или химерное антитело 8A4, которое специфично связывается с тау человека, причем 8A4 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 91 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 92. Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 8A4, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 8A4.

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

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

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

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

Некоторые антитела представляют собой гуманизированные антитела. Некоторые антитела представляют собой гуманизованное или химерное антитело 7G6, которое специфично связывается с тау человека, причем 7G6 представляет собой антитело мыши, которое характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 119 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 120. Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 7G6, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 7G6. В некоторых антителах CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений согласно Кэботу, Чотиа, сводного определения Кэбота/Чотиа, AbM и контактного определения. В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 121-123), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно сводному определению Кэбота/Чотиа (SEQ ID NO: 124-126). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 122 и SEQ ID NO: 123), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно Кэботу (SEQ ID NO: 124-126). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: 123), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно Чотиа (SEQ ID NO: 124-126). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно AbM (SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 131 и SEQ ID NO: 123), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно AbM (SEQ ID NO: 124-126). В некоторых антителах гуманизованная зрелая переменная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 7G6 согласно контактному определению (SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 132 и SEQ ID NO: 133), и гуманизованная зрелая переменная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 7G6 согласно контактному определению (SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135 и SEQ ID NO: 136).

Некоторые антитела содержат гуманизованную зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 139-140, и гуманизованную зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 141-148.

В некоторых антителах по меньшей мере одно из следующих положений в области VH занимает аминокислота, как указано: H12 занимает V, H20 занимает L, H69 занимает I, H76 занимает N, H78 занимает A, H80 занимает L, H81 занимает Q, H92 занимает S, и H93 занимает T. В некоторых антителах положения H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93, H101 в области VH занимает V, L, I, N, A, L, Q, S и T, соответственно.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[illegible]

В некоторых антигенах зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и зрелая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислот-

ную последовательность SEQ ID NO: 141. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и зрелая переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148.

Например, антитело может представлять собой химерное антитело. Например, антитело может представлять собой венированное антитело. Антитело может представлять собой интактное антитело. Антитело может представлять собой связывающий фрагмент. В варианте реализации связывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, Fab или Fab'-фрагмент. Антитело может представлять собой Fab-фрагмент или одноцепочечный Fv. Некоторые из антител относятся к изотипу IgG1 человека, тогда как другие могут относиться к изотипу IgG2 или IgG4 человека. Некоторые антитела содержат зрелую переменную область легкой цепи, слитую с константной областью легкой цепи, и зрелую переменную область тяжелой цепи, слитую с константной областью тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи некоторых антител представляет собой мутантную форму природной константной области тяжелой цепи человека, которая характеризуется пониженным связыванием с рецептором Fcγ по сравнению с природной константной областью тяжелой цепи человека. В некоторых антителах константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1. Некоторые антитела могут содержать по меньшей мере одну мутацию в константной области, такую как мутация, которая снижает фиксацию или активацию комплемента константной областью, например, мутацию в одном или нескольких из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 и 331 согласно нумерации EU. Некоторые антитела содержат аланин в положениях 318, 320 и 322.

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, антитела 5G8 мыши, причем 5G8 характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 8. Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы гуманизации любого антитела, отличного от антитела человека, описанного в настоящем документе, например, антитела 6A10 мыши, причем 6A10 характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 63 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 64. Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы гуманизации любого антитела, отличного от антитела человека, описанного в настоящем документе, например, антитела 8A4 мыши, причем 8A4 характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 91 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 92. Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы гуманизации любого антитела, отличного от антитела человека, описанного в настоящем документе, например, антитела 7G6 мыши, причем 7G6 характеризуется зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 119 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 120. Такие способы могут включать в себя отбор одного или нескольких акцепторных антител, идентификацию аминокислотных остатков антитела мыши, которые необходимо сохранить, синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей 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 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6. 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 часа. Из отобранных клеток можно выделить единичные клетки. Затем клетки, клонированные из единичной клетки, можно использовать для создания банка клеток. Единичные клетки можно отобрать в зависимости от желаемых свойств, таких как выход антитела. Иллюстративные линии клеток представляют собой линии клеток, экспрессирующие 5G8.

В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования или снижения агрегации тау у субъекта, который страдает от опосредованного тау амилоидоза или подвержен риску развития опосредованного тау амилоидоза, причем указанные способы включают в себя введение субъекту эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого ингибирование или снижение агрегации тау у субъекта. Иллюстративные антитела включают гуманизированные версии 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6.

Также предложены способы лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанные способы включают в себя 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 С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (Lewy body variant of Alzheimer disease, LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). В некоторых способах связанное с 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 в себя введение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого снижение передачи тау. Также предложены способы индукции фагоцитоза тау, причем указанные способы включают в себя введение эффективного режима антитела, раскрытого в настоящем документе, и посредством этого индукцию фагоцитоза тау.

Также предложены способы ингибирования агрегации или накопления тау, причем указанные способы включают в себя введение 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 в себя введение 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 в себя введение субъекту антитела, раскрытого в настоящем документе, и обнаружение антитела, связавшегося с тау, у субъекта. Примерами такого заболевания являются болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

Согласно некоторым вариантам реализации антитело вводят в организм субъекта посредством внутривенной инъекции. Согласно некоторым вариантам реализации антитело вводят непосредственно в головной мозг субъекта посредством внутримозговой 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 в себя измерение первого уровня отложений тау-белка у субъекта до лечения посредством введения субъекту антитела, раскрытого в настоящем документе, и обнаружение первого количества антитела, связавшегося с тау, у субъекта, введение субъекту лечения, измерение второго уровня отложений тау-белка у субъекта после лечения посредством введения субъекту антитела, и обнаружение антитела, связавшегося с тау, у субъекта, причем снижение уровня 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 в себя измерение первого уровня отложений тау-белка у субъекта до лечения посредством введения субъекту антитела, раскрытого в настоящем документе, и обнаружение первого количества антитела, связавшегося с тау, у субъекта, введение субъекту лечения, измерение второго уровня отложений тау-белка у субъекта после лечения посредством введения субъекту антитела, и обнаружение 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11 аминокислот.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А, 1В и 1С представлены результаты скрининговых анализов ELISA отобранных моноклональных антител мыши против тау.

На фиг. 2 представлена кинетика связывания отобранных моноклональных антител мыши против тау с рекомбинантным тау человека.

На фиг. 3 представлены результаты функциональных блокирующих анализов отобранных моноклональных антител мыши против тау.

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

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

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

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

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

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

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

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

На фиг. 12 представлено выравнивание переменных областей легкой цепи антитела 7G6 мыши, акцепторных 3U0T_VL человека и гуманизированных версий антитела 7G6 (hu7G6-VL-v1, hu7G6-VL-v2, hu7G6-VL-v3, hu7G6-VL-v4, hu7G6-VL-v5, hu7G6-VL-v6, hu7G6-VL-7 и hu7G6-VL-8).

Краткое описание последовательностей

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

В SEQ ID NO: 2 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау человека (Swiss-Prot P10636-7).

В SEQ ID NO: 3 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау человека (Swiss-Prot P10636-6) (тау человека 4R0N).

В SEQ ID NO: 4 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау человека (Swiss-Prot P10636-5).

В SEQ ID NO: 5 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау человека (Swiss-Prot P10636-4).

В SEQ ID NO: 6 представлена аминокислотная последовательность изоформы тау человека (Swiss-Prot P10636-2).

В SEQ ID NO: 7 представлена аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела 5G8 мыши.

В SEQ ID NO: 8 представлена аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела 5G8 мыши.

В SEQ ID NO: 9 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая переменную область тяжелой цепи антитела 5G8 мыши, с сигнальным пептидом.

В SEQ ID NO: 10 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая переменную область легкой цепи антитела 5G8 мыши, с сигнальным пептидом.

В SEQ ID NO: 11 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 5G8 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа.

В SEQ ID NO: 12 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 5G8 мыши согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 13 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 5G8 мыши согласно Кэботу.

В SEQ ID NO: 14 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 5G8 мыши согласно Кэботу.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В SEQ ID NO: 27 представлена аминокислотная последовательность модельной последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела 3F4 мыши против прионов, учетн. № 1CR9 Н.

В SEQ ID NO: 28 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательно-
сти гуманизированного Fab против дабигатрана aDabi-Fab2b-VH, учетн. № 4YHM Н.

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

В SEQ ID NO: 30 представлена аминокислотная последовательность модельной последовательности варибельной области легкой цепи антитела мыши против прионов 3F4, учет. № 1CR9 L.

В SEQ ID NO: 31 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательности человека гуманизированного Fab против дабигатрана aDabi-Fab2b-VL, учета. № 4YHM L.

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

В SEQ ID NO: 33 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH 1.

цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH₁ 2.

В SEQ ID NO: 35 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH 3.

В SEQ ID NO: 36 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH 4.

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

цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH₆.
 В SEQ ID NO: 38 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH₆.

В SEQ ID NO: 39 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела 5G8 hu5G8-VH 7.

В SEQ ID NO: 40 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VH 8.

цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VL₁.
 В SEQ ID NO: 41 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VL₁.

В SEQ ID NO: 42 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VL 2.

В SEQ ID NO: 43 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VL 3.

В SEQ ID NO: 44 представлена аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5G8 hu5G8-VL 4.

В SEQ ID NO: 76 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 6A10 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 77 представлена аминокислотная последовательность CDR-H3 антитела 6A10 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 78 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 6A10 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 79 представлена аминокислотная последовательность CDR-L2 антитела 6A10 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 80 представлена аминокислотная последовательность CDR-L3 антитела 6A10 мыши согласно контактному определению.

В SEQ ID NO: 81 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательности переменной области тяжелой цепи человека, учетный № ACR16112.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В SEQ ID NO: 91 представлена аминокислотная последовательность зрелой переменной области тяжелой цепи антитела 8A4 мыши.

В SEQ ID NO: 92 представлена аминокислотная последовательность зрелой переменной области легкой цепи антитела 8A4 мыши.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В SEQ ID NO: 109 представлена аминокислотная последовательность модельной последовательности 3JAUVN.

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

В SEQ ID NO: 111 представлена аминокислотная последовательность модельной последовательности 3JAUVL.

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

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

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

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

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

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

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

В SEQ ID NO 119 представлена аминокислотная последовательность зрелой варибельной области тяжелой цепи антитела 7G6 мыши.

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

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

В SEQ ID NO: 122 представлена аминокислотная последовательность CDR-H2 антитела 7G6 мыши согласно Кэботу.

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

В SEQ ID NO: 124 представлена аминокислотная последовательность CDR-L1 антитела 7G6 мыши согласно Кэботу.

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

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

В SEQ ID NO: 127 представлена аминокислотная последовательность CDR-H1 антитела 7G6 мыши согласно Кэботу.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В SEQ ID NO: 138 представлена аминокислотная последовательность акцепторной последовательности человека варибельной области легкой цепи каппа человека, учетный № PDB 3U0T_VL.

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

В SEQ ID NO: 140 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VH_2.

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

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

В SEQ ID NO: 143 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VL_3.

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

В SEQ ID NO: 145 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VL_5.

В SEQ ID NO: 146 представлена аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 7G6 hu7G6-VL_6.

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

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

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

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 различимым 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 варибельную область из приблизительно 100 - 110 или более аминокислот, отвечающих, главным образом, за распознавание антигена. Данная варибельная область изначально экспрессируется связанной с отщепляемым сигнальным пептидом. Варибельную область без сигнального пептида иногда называют зрелой варибельной областью. Таким образом, например, зрелая варибельная область легкой цепи означает варибельную 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 варибельные и константные области связаны "J"-областью, состоящей из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также содержит "D"-область, состоящую приблизительно из 10 или более аминокислот. (См., в общих чертах, руководство *Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 (полностью включено посредством ссылки для всех целей)).

Варибельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (которую также называют в настоящем документе "варибельный домен легкой цепи" ("домен VL") или "варибельный 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. Когда в заявке раскрыта последовательность VL с R в качестве С-концевого остатка, R можно в качестве альтернативы считать N-концевым остатком константной области легкой цепи. Таким образом, настоящую заявку также следует понимать как раскрывающую последовательность VL без С-концевого R.

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)₂, Dab, нано-

тела 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 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6 и пару тяжелой цепи/легкой цепи, специфичную в отношении отличного эпитопа на тау, чем таковой, с которым связывается 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6.

В некоторых биспецифичных антителах одна пара тяжелой цепи/легкой цепи представляет собой гуманизированное антитело 5G8, гуманизированное антитело 6A10, гуманизированное антитело 8A4 или гуманизированное антитело 7G6, как более подробно раскрыто ниже, а другая пара тяжелой цепи/легкой цепи получена из антитела, которое связывается с рецептором, который экспрессирован на гематоэнцефалическом барьере, таким как инсулиновый рецептор, рецептор инсулиноподобного фактора роста (ИФР), лептиновый рецептор или липопротеиновый рецептор, или трансферриновый рецептор (Friden et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775, 1991; Friden et al., *Science* 259:373-377, 1993). Такое биспецифичное антитело может переноситься через гематоэнцефалический барьер в результате рецепторопосредованного 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 вариабельным доменом (dual-variable-domain antibody, DVD-Ig), в котором каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два вариабельных домена в тандеме через короткую пептидную связь (Wu et al., *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule*, In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab (тандемное антитело), которое представляет собой слияние двух одноцепочечных диател с получением тетравалентного биспецифичного антитела, содержащего два связывающих сайта для каждого из антигенов-мишеней; (3) антитело flexibody, которое представляет собой комбинацию scFv с диателом с получением мультивалентной молекулы; (4) так называемую молекулу, полученную методом "замка на причале" ("dock and lock"), на основе "домена димеризации и докинга" в протеинкиназе A, которая при применении с Fab позволяет получить тривалентный биспецифичный связывающий белок, состоящий из двух идентичных Fab-фрагментов, присоединенных к отличному Fab-фрагменту; или (5) так называемую молекулу Scorpion, содержащую, например, два scFv, слитых с обоими концами Fc-области человека. Примеры платформ, пригодных для получения биспецифичных антител, включают BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab и Mab2 (F-star), Fc-сконструированный IgG1 (Xencor) или DuoBody (на основе замены плеча Fab, Genmab). Термин "эпитоп" означает сайт на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, которые сблизились в результате третичного фолдинга одного или нескольких белков. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами (также известны как линейные эпитопы), как правило, устойчивы к воздействию денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные в результате третичного фолдинга (также известны как конформационные эпитопы), обычно разрушаются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 3 или более, чаще не менее 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, руководство *Epitope Mapping Protocols*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

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 связанным с тау заболеванием, или который по меньшей мере, как известно или как подозревают, не содержит пораженные заболеванием области данного типа. Контрольные образцы можно получить от индивидуумов, не страдающих от связанного с тау заболевания. В качестве альтернативы, контрольные образцы можно получить от пациентов, страдающих от связанного с тау заболевания. Такие образцы можно получить одновременно с биологическим образцом, который, как считают, содержит связанное с тау заболевание, или в другой раз. Биологический образец и контрольный образец можно получить из одной ткани. Предпочтительно, контрольные образцы состоят из по существу или полностью нормальных, здоровых областей, и их можно применять при сравнении с биологическим образцом, который, как считают, содержит области, пораженные связанным с тау заболеванием. Предпочтительно, ткань в контрольном образце относится к тому же типу, что и ткань в биологическом образце. Предпочтительно, пораженные связанным с тау заболеванием клетки, которые, как считают, находятся в биологическом 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 специфично связываются с тау. Некоторые иллюстративные специфичности связывания антител согласно настоящему изобретению характеризуются специфичным связыванием с пептидом, состоящим из остатков 199-213, или с пептидом, состоящим из остатков 262-276 SEQ ID NO: 3 (которые соответствуют остаткам 257-271 или 320-334, соответственно, SEQ ID NO: 1), или с обоими пептидами. Иллюстративные антитела согласно настоящему изобретению представляют собой 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6. Некоторые антитела связываются с эпитопом, содержащим по меньшей мере один остаток из остатков 199-213, или по меньшей мере один остаток из остатков 262-276 SEQ ID NO: 3, или с обоими эпитопами. Некоторые антитела связываются с эпитопом, в котором все остатки эпитопа находятся в пределах остатков 119-213, или остатков 262-276 SEQ ID NO: 3, или в пределах обеих групп остатков. Некоторые антитела связываются с эпитопом, образованным из аминокислот в пределах как остатков 199-213, так и остатков 262-276 SEQ ID NO: 3. Некоторые антитела связываются с эпитопом в пределах остатков 199-213 SEQ ID NO: 3 или с остатками 262-276 SEQ ID NO: 3. Некоторые антитела связываются с тау вне зависимости от статуса фосфорилирования. Некоторые антитела ингибируют или отсрочивают связанные с тау патологии и связанные ухудшения симптомов. Несмотря на то что для реализации настоящего изобретения на практике понимание механизма не является необходимым, снижение токсичности может возникнуть в результате индуцированного антителом фагоцитоза тау, ингибирования меж- или внутримолекулярной агрегации тау или связывания с другими молекулами, посредством стабилизации нетоксичной конформации, посредством ингибирования межклеточной или внутриклеточной передачи патогенной формы тау, посредством блокады фосфорилирования тау, посредством предотвращения связывания тау с клетками или посредством индукции протеолитического расщепления тау, помимо других механизмов. Антитела согласно настоящему изобретению или средства, которые индуцируют такие антитела, можно применять в способах лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера и других заболеваний, связанных с тау.

II. Молекулы-мишени.

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

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

```

10  20  30  40  50  60
MAEPRQFEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG
70  80  90 100 110 120

```

SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD
TPSLEDEAAG

130 140 150 160 170 180

HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR
IPAKTPPAPK

190 200 210 220 230 240

TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRs RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
250 260 270 280 290 300

SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK
CGSKDNIKHV

310 320 330 340 350 360

PGGGSVQIVY KPVDSLKVTs KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV
QSKIGSLDNI

370 380 390 400 410 420

THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN
VSSTGSIDMV

430 440

DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

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 RIPA KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS
PGSPGTPGSR

190 200 210 220 230 240

SRTPSLPTPP TREPKKAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK
IGSTENLKHQ

250 260 270 280 290 300

PGGGKVQIIN KKLDLSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV YKPVDLSKVT
SKCGSLGNIH

310 320 330 340 350 360

HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR
ENAKAKTDHG

370 380 390 400 410

AEIVYKSPVV SGDTSPRHL NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

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

10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEEAGI
GDTPSLEDEA

70 80 90 100 110 120

AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA
TRIPAKTPPA

130 140 150 160 170 180

PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS

190 200 210 220 230 240

AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ
SKCGSKDNIH

250 260 270 280 290 300

HVPGGGSVQI VYKPVDLSKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLDKDR
RVQSKIGSLD

310 320 330 340 350 360

NITHVPGGGN KKIETHKLTF RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSPRHL
SNVSSTGSID

370 380

MVDSPQLATL ADEVASLAK QGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG

70 80 90 100 110 120

SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIPEG TTAEAEAGIGD
TPSLEDEAAG

130 140 150 160 170 180

HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR
IPAKTPPAPK

190 200 210 220 230 240

TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK

250 260 270 280 290 300

SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK
CGSLGNIHHK

310 320 330 340 350 360

PGGGQVEVKS EKLDKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTREN
AKAKTDHGAE

370 380 390 400 410

IVYKSPVVS DTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFV 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

SRTPSLTPPT TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK
IGSTENLKHQ

250 260 270 280 290 300

PGGGKVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV
QSKIGSLDNI

310 320 330 340 350 360

THVPGGGNKK IETHKLTRE 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 AGLKAEEAGI
 GDTPSLEDEA

70 80 90 100 110 120
 AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA
 TRIPAKTPPA

130 140 150 160 170 180
 PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS

190 200 210 220 230 240
 AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDSLKVT
 SKCGSLGNIH

250 260 270 280 290 300
 HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR
 ENAKAKTDHG

310 320 330 340 350
 AEIVYKSPVV SGTSPRHLS 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, среди прочих, деменция, болезнь Пика, надъядерный паралич (см., например, базу данных Swiss-Prot и публикацию Poorkaj, et al. Ann Neurol. 43:815-825 (1998)). Некоторые примеры мутаций тау, пронумерованных согласно изоформе 441, представляют собой мутацию лизина на треонин в остатке аминокислоты 257 (K257T), мутацию изолейцина на валин в положении аминокислоты 260 (I260V); мутацию глицина на валин в положении аминокислоты 272 (G272V); мутацию аспарагина на лизин в положении аминокислоты 279 (N279K); мутацию аспарагина на гистидин в положении аминокислоты 296 (N296H); мутацию пролина на серин в положении аминокислоты 301 (P301S); мутацию пролина на лейцин в положении аминокислоты 301 (P301L); мутацию глицина на валин в положении аминокислоты 303 (G303V); мутацию серина на аспарагин в положении 305 (S305N); мутацию глицина на серин в положении аминокислоты 335 (G335S); мутацию валина на метионин в положении 337 (V337M); мутацию глутаминовой кислоты на валин в положении 342 (E342V); мутацию лизина на изолейцин в положении аминокислоты 369 (K369I); мутацию глицина на аргинин в положении аминокислоты 389 (G389R); и мутацию аргинина на триптофан в положении аминокислоты 406 (R406W).

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

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

III. Антитела.

A. Специфичность связывания и функциональные свойства.

В настоящем изобретении предложены антитела, которые связываются с тау. Некоторые антитела связываются с тау вне зависимости от статуса фосфорилирования. Некоторые антитела связываются с эпитопом, не содержащим остаток, подлежащий фосфорилированию. Данные антитела можно получить посредством иммунизации полипептидом тау, очищенным из природного источника или экспрессированным рекомбинантным способом. Можно провести скрининг антител в отношении связывания с тау в нефосфорилированной форме, а также в форме, в которой один или несколько остатков, поддающихся фосфорилированию, являются фосфорилированными. Такие антитела, предпочтительно, связываются с

неотличимыми аффинностями или по меньшей мере в пределах 1,5-, 2- или 3-кратной величины аффинности с фосфорилированным тау по сравнению с нефосфорилированным тау (т.е. являются "панспецифичными"). 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 представляет собой примеры панспецифичных моноклональных антител. В настоящем изобретении также предложены антитела, связывающиеся с тем же или с перекрывающимся эпитопом, что и эпитоп 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6. Также включены антитела, конкурирующие за связывание с тау с 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6.

Вышеупомянутые антитела можно получить *de novo* посредством иммунизации полноразмерным полипептидом тау или его пептидным фрагментом. 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 аминокислотами. 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. Общепринято используют некоторые носители, в частности, гемоцианин фисуреллы (keyhole limpet hemocyanin, KLH), овальбумин и бычий сывороточный альбумин (BCA). 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 m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид (MBS) (см., например, публикации Harlow, E. et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1988; Sinigaglia et al., *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz et al., *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer et al., *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. et al., *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; и Southwood et al. *J. Immunology*, 160:3363-3373 (1998)). Носитель и спейсер, в случае наличия, могут быть присоединены к 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 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 5G8, представляет собой одно такое иллюстративное антитело мыши. Если из контекста не очевидно обратное, упоминание о 5G8 следует понимать как упоминание о любой из формы мыши, химерной, венированной и гуманизированной формы данного антитела. Антитело было депонировано как [НОМЕР ДЕПОНИРОВАНИЯ]. Данное антитело также характеризуется способностью связываться как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным тау, как с непатологической, так и с патологической формами и конформациями тау, и с неправильно свернутыми/агрегированными формами тау.

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

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

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

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

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

Некоторые антитела согласно настоящему изобретению связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и антитело, обозначенное 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 или 3D6. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 5G8 обозначены SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 6A10 обозначены SEQ ID NO: 63 и 64, соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 8A4 обозначены SEQ ID NO: 91 и 92, соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 7G6 обозначены SEQ ID NO: 119 и 120, соответственно. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 3D6 обозначены SEQ ID NO: 55 и 59, соответственно. Другие антитела, характеризующиеся такой специфичностью связывания, можно получить посредством иммунизации мышей тау или его частью, содержащей желаемый эпитоп, и проведения скрининга полученных в результате антител в отношении связывания с тау, необязательно в конкуренции с антителом, содержащим переменные области 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 или 3D6 (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, 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 или 3D6), можно также получить с применением варианта способа фагового дисплея. См. публикацию Winter, WO 92/20791. Данный способ, в частности, подходит для получения антител человека. В данном способе 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 10^8 и, предпочтительно, по меньшей мере 10^9 M^{-1}). Затем переменные области тяжелой цепи из данного фага используют в качестве исходного материала для конструирования следующей фаговой библиотеки. В данной

библиотеке каждый фаг экспонирует одну и ту же 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 специфическое связывание с тау или его фрагментом. Полученные в результате антитела обычно характеризуются одинаковой или аналогичной эпитопной специфичностью, что и исходный материал мыши.

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

В табл. 2 представлены CDR 5G8 согласно определениям Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота (также называют в настоящем документе "сводное определение Кэбота/Чотиа"), AbM и контактному определению.

Таблица 2
CDR 5G8 согласно определению Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота, AbM и контактному определению

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

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

В табл. 3 представлены CDR 6A10 согласно определениям Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота (также называют в настоящем документе "сводное определение Кэбота/Чотиа"), AbM и контактному определению.

Таблица 3
 CDR 6A10 согласно определению Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота, AbM и контактному определению

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

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

В табл. 4 представлены CDR 8A4 согласно определениям Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота (также называют в настоящем документе "сводное определение Кэбота/Чотиа"), AbM и контактному определению.

Таблица 4
 CDR 8A4 согласно определению Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота,
 AbM и контактному определению

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

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

В табл. 5 представлены CDR 7G6 согласно определениям Кэбота, Чотиа, сводному определению Чотиа и Кэбота (также называют в настоящем документе "сводное определение Кэбота/Чотиа"), AbM и контактному определению.

Таблица 5
CDR 7G6 согласно определению Кэбота, Чотиа, сводному определению
Чотиа и Кэбота, AbM и контактному определению

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

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

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

функционально несущественных замен аминокислот (например, консервативных замен), делеций или вставок.

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 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. Такой скрининг можно осуществить посредством определения связывания антитела с совокупностью вариантов тау и определения того, какие варианты тау связываются с антителом. Связывание можно оценить, например, методом вестернблоттинга, FACS или ELISA.

С. Гуманизированные антитела.

Гуманизированное антитело представляет собой генно-инженерное антитело, в котором CDR от "донорного" антитела, отличного от антитела человека, переносят в "акцепторные" последовательности антитела человека (см., например, публикации Queen, US 5,530,101 и 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; и Foote, US 6,881,557). Последовательности акцепторного антитела могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, объединение таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антитела человека или последовательность зародышевой области. Таким образом, 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, характеризуются идентичностью последовательности от приблизительно 60% до 100% с последовательностями зародышевой линии человека, такие как, например, в диапазоне от приблизительно 60% до 69%, от 70% до 79%, от 80% до 84% или от 85% до 89%. Некоторые тяжелые цепи не дотягивают до определения согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются, например, идентичностью последовательности приблизительно 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81% или 82%, 83% или 84% с последовательностями зародышевой линии человека, тогда как другие тяжелые цепи соответствуют определению согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или большей идентичностью последовательности с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые из легких цепей гуманизированных антител, предложенных в настоящем документе, характеризуются идентичностью последовательности от приблизительно 60% до 100% с последовательностями зародышевой линии человека, такими как, например, в диапазоне от приблизительно 80% до 84% или от 85% до 89%. Некоторые легкие цепи не дотягивают до определения согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются, например, идентичностью последовательности приблизительно 81%, 82%, 83% или 84% с последовательностями зародышевой линии человека, тогда как другие легкие цепи соответствуют определению согласно МНН ВОЗ 2014 г. и характеризуются приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или большей идентичностью последовательности с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в настоящем документе, которые являются "химерными" в соответствии с определением согласно МНН ВОЗ 2014 г., содержат тяжелые цепи с идентичностью менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренные с легкими цепями, которые характеризуются идентичностью менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в настоящем документе, являются "смешанными" в соответствии с определением согласно МНН ВОЗ 2014 г., например, содержат тяжелую цепь с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренную с легкой цепью, которая характеризуется идентичностью последовательности менее 85% с последовательностями зародышевой линии человека, или наоборот. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в настоящем документе, соответствуют определению "гуманизированного" антитела согласно МНН ВОЗ 2014 г. и содержат тяжелую цепь с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека, спаренную с легкой цепью, которая характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере 85% с последовательностями зародышевой линии человека. Иллюстративные антитела 5G8, которые соответствуют определению "гуманизированных" согласно МНН ВОЗ 2014 г., включают антитела, содержащие зрелую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, спаренную со зрелой легкой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 или SEQ ID NO: 46. Дополнительные гуманизированные антитела 5G8 согласно настоящему изобретению включают антитела, содержащие зрелую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 33-40, спаренную со зрелой легкой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 41-46. Гуманизированные антитела 6A10 согласно настоящему изобретению включают антитела, содержащие зрелую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85-87, спаренную со зрелой легкой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 88-90. Гуманизированные антитела 8A4 согласно настоящему изобретению включают антитела, содержащие зрелую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 113-115, спаренную со зрелой легкой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 116-118. Гуманизированные антитела 7G6 согласно настоящему изобретению включают антитела, содержащие зрелую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 139-140, спаренную со зрелой легкой цепью, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 141-148.

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 5G8 представляет собой гуманизированную aDabi-Fab2b-VH против дабигатрана с учетным кодом NCBI 4YHM_H (SEQ ID NO: 28). Другой пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи 5G8 представляет собой ген зародышевой линии человекаIGHV1-46 с учетным кодом NCBI P01743.2 (SEQ ID NO: 29). Пример акцепторной последовательности для легкой цепи 5G8 представляет собой гуманизированную aDabi-Fab2b-VL против дабигатрана с учетным кодом NCBI 4YHM_L (SEQ ID NO: 31). Другой пример акцепторной последовательности для легкой цепи 5G8 представляет собой ген зародышевой линии человека IGKV2-29 с учетным кодом NCBI A2NJV5.2 (SEQ ID NO: 32).

Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи 6A10 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи человека с учетным № ACR16112 (SEQ ID NO: 81). Пример акцепторной последовательности для легкой цепи 6A10 представляет собой вариабельную область легкой цепи каппа человека с учетным № ABC66863 (SEQ ID NO: 83).

Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи 8A4 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи человека с учетным № ADU57742 (SEQ ID NO: 110). Пример акцепторной последовательности для легкой цепи 8A4 представляет собой вариабельную область легкой цепи каппа человека с учетным № ABA26100 (SEQ ID NO: 112).

Пример акцепторной последовательности для тяжелой цепи 7G6 представляет собой область VH антитела человека с учетным № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO: 137). Пример акцепторной последовательности для легкой цепи 7G6 представляет собой область VL антитела человека с учетным № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138). 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 5G8 мыши, включая 8 иллюстративных гуманизированных зрелых вариабельных областей тяжелой цепи (hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO: 33), hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO: 34), hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO: 35), hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO: 36), hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO: 37), hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO: 38), hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO: 39), hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO: 40)).

36), hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO: 37), hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO: 38), hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO: 39) и hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO: 40)) и 6 иллюстративных гуманизированных зрелых переменных областей легкой цепи (hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO: 41), hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO: 42), hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO: 43), hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO: 44), hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO: 45) и hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO: 46)).

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

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

В настоящем изобретении предложены гуманизированные формы антитела 7G6 мыши, включая 2 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области тяжелой цепи (hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO: 139) и hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO: 140)) и 8 иллюстративных гуманизированных зрелых переменных областей легкой цепи (hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO: 141), hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO: 142), hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO: 143), hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO: 144), hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO: 145), hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO: 146), hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO: 147) и hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO: 148)). 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 5,530,101 иногда в качестве альтернативы называют каноническими и верньерными остатками. Каркасные остатки, которые помогают определить конформацию петли CDR, иногда называют каноническими остатками (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Thornton & Martin, J. Mol. Biol. 263:800-815 (1996)). Каркасные остатки, которые поддерживают конформацию антигенсвязывающей петли и играют роль в тонкой настройке соответствия антитела антигену, иногда называют верньерными остатками (Foote & Winter, J. Mol. Biol. 224:487-499 (1992)).

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 глутамин (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 глутамин (Q). В связи с утратой первичного амина при конверсии глутамин 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 глутамин на глутамат представляют собой SEQ ID NO: 35 (hu5G8-VH_v3), SEQ ID NO: 36 (hu5G8-VH_v4), SEQ ID NO: 37 (hu5G8-VH_v5), SEQ ID NO: 38 (hu5G8-VH_v6) и SEQ ID NO: 40 (hu5G8-VH_v8).

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

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

По причинам, таким как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелой и легкой цепями, взаимодействие с константной областью, представление собой сайта для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, представление собой необычного остатка для своего положения в последовательности переменной

области человека и вследствие этого - потенциально иммуногенного, приобретение потенциала агрегации, и по другим причинам следующие 23 каркасные положения 5G8 посчитали кандидатами для замен в 6 иллюстративных зрелых переменных областях легкой цепи человека и 8 иллюстративных зрелых переменных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примере 6: L2 (I2V), L7 (T7S), L17 (Q17E), L36 (Y36L), L45 (K45Q), L46 (G46R), L70 (G70D), H1 (Q1E), H11 (V11L), H12 (K12V), H19 (K19R), H20 (V20L), H23 (K23A), H46 (E46D), H48 (M48I), H66 (K66R), H67 (A67V), H71 (R71S), H76 (S76N), H78 (A78V), H80 (M80L), H93 (T93S или T93A), H94 (I94P или I94R).

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 5G8, например, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v5 или hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v6.

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

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

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

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

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

В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: H1 занимает Q или E, H11 занимает V или L, H12 занимает K или

V, H19 занимает К или R, H20 занимает V или L, H23 занимает К или А, H46 занимает Е или D, H48 занимает М или I, H66 занимает К или R, H67 занимает А или V, H71 занимает R или S, H76 занимает S или N, H78 занимает А или V, H80 занимает М или L, H93 занимает Т, S или А, и H94 занимает I, Р или R. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает I, S, S и P, соответственно, как в hu5G8-VH_v2. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает E, I, S, S и P, соответственно, как в hu5G8-VH_v3. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H46, H48, H71, H93 и H94 в области VH занимает E, D, I, S, S и P, соответственно, как в hu5G8-VH_v4. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93 и H94 в области VH занимает E, L, V, R, L, D, I, S, N, L, S и P, соответственно, как в hu5G8-VH_v5. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H11, H12, H19, H20, H23, H46, H48, H71, H76, H80, H93 и H94 в области VH занимает E, L, V, R, L, A, D, I, S, N, L, S и P, соответственно, как в hu5G8-VH_v6. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H66, H67, H78, H93 и H94 в области VH занимает R, V, V, A и R, соответственно, как в hu5G8-VH_v7. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения H1, H46, H48, H66, H67, H71, H78, H93 и H94 в области VH занимает E, D, I, R, V, S, V, S и P, соответственно, как в hu5G8-VH_v8. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает V, L36 занимает L, и L46 занимает R. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения L2, L36 и L46 в области VL занимает V, L и R, соответственно.

В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L2 занимает V, L36 занимает L, L46 занимает R, и L70 занимает D. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения L2, L36, L46 и L70 в области VL занимает V, L, R и D, соответственно. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 по меньшей мере одно из следующих положений занимает аминокислота, как указано: L45 занимает Q, и L70 занимает D. В некоторых гуманизированных антителах 5G8 положения L45 и L70 в области VL занимает Q и D, соответственно.

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

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

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

Антитело 6A10 мыши содержит зрелые вариабельные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые содержат SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64, соответственно. В настоящем изобретении предложены 3 иллюстративные гуманизированные зрелые вариабельные области тяжелой цепи 6A10: hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2 и hu6A10-VH_v3. В настоящем изобретении также предложены 3 иллюстративные гуманизированные зрелые вариабельные области легкой цепи 6A10: hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2 и hu6A10-VL_v3. Представлены выравнивания 6A10 мыши и различных гуманизированных антител для вариабельных областей легкой цепи (табл. 12 и фиг. 8) и для вариабельных областей тяжелой цепи (табл. 13 и фиг. 7).

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 вариабельной области человека и вследствие этого - потенциально иммуногенного, приобретение потенциала агрегации, и по другим причинам следующие 7 каркасных положений вариабельной области посчитали кандидатами для замен в 3 иллюстративных зрелых вариабельных областях легкой цепи человека и 3 иллюстративных зрелых вариабельных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примере 7: L12 (P12S), L17 (Q17E), L46 (R46L), H16 (A16G), H48 (M48I), H69 (T69I) и H80 (M80L).

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 вариабельной области упомянутый первым остаток представляет собой остаток человека, а в пределах CDR упомянутый первым остаток представляет собой остаток

мышь.

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

В настоящем изобретении предложены варианты гуманизированного антитела 6A10, в которых гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2 и hu6A10-VH_v3, (SEQ ID NO: 85-87), и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2, hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO: 88-90). В некоторых таких антителах сохраняется по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или все 7 из обратных мутаций или других мутаций, обнаруженных в SEQ ID NO: 85-87 и SEQ ID NO: 88-90.

В некоторых гуманизированных антителах 6A10 положение H48 в области VH занимает I.

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

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

В некоторых гуманизированных антителах 6A10 положение L46 в области VL занимает L.

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

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

Иллюстративные гуманизированные антитела представляют собой гуманизированные формы 8A4 мыши, обозначенные Hu8A4.

Антитело 8A4 мыши содержит зрелые вариабельные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые содержат SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно. В настоящем изобретении предложены 3 иллюстративные гуманизированные зрелые вариабельные области тяжелой цепи: hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2 и hu8A4-VH_v3. В настоящем изобретении также предложены 3 иллюстративные зрелые вариабельные области легкой цепи человека: hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2 и hu8A4-VL_v3. Представлены выравнивания 8A4 мыши и различных гуманизированных антител для вариабельных областей легкой цепи (табл. 18 и фиг. 10) и для вариабельных областей тяжелой цепи (табл. 19 и фиг. 9).

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 вариабельной области человека и вследствие этого - потенциально иммуногенного, приобретение потенциала агрегации, и по другим причинам следующие 11 каркасных положений вариабельной области 8A4 посчитали кандидатами для замен в 3 иллюстративных зрелых вариабельных областях легкой цепи человека и 3 иллюстративных зрелых вариабельных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примере 8: L2 (I2V), L17 (Q17E), L36 (F36L), H12 (K12V), H16 (S16G), H20 (V20L), H48 (M48I), H67 (I67A), H68 (N68T), H85 (D85E) и H93 (A93S).

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 вариабельной области упомянутый первым остаток представляет собой остаток человека, а в пределах CDR упомянутый первым остаток представляет собой остаток мыши.

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

В настоящем изобретении предложены варианты гуманизированного антитела 8A4, в которых гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2 и hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO: 113-

115), и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2, hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO: 116-118). В некоторых таких антителах сохраняется по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 из обратных мутаций или других мутаций, обнаруженных в SEQ ID NO: 113-115 и SEQ ID NO: 116-118.

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

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

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

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

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

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

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

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

Антитело 7G6 мыши содержит зрелые вариабельные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые содержат SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 120, соответственно. В настоящем изобретении предложены 2 иллюстративные гуманизированные зрелые вариабельные области тяжелой цепи: hu7G6-VH_v1 и hu7G6-VH_v2. В настоящем изобретении также предложены 8 иллюстративных зрелых вариабельных областей легкой цепи человека: hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7 и hu7G6-VL_v8. Представлены выравнивания 7G6 мыши и различных гуманизированных антител для вариабельных областей легкой цепи (табл. 25 и фиг. 12) и для вариабельных областей тяжелой цепи (табл. 26 и фиг. 11).

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 вариабельной области человека и вследствие этого - потенциально иммуногенного, приобретение потенциала агрегации, и по другим причинам следующие 16 каркасных положений вариабельной области 7G6 посчитали кандидатами для замены в 8 иллюстративных зрелых вариабельных областях легкой цепи человека и 2 иллюстративных зрелых вариабельных областях тяжелой цепи человека, дополнительно указанных в примере 9: L12 (P12S), L36 (F36L), L37 (Q37L), L45 (R45K), L100 (Q100G), L103 (R103K), H12 (K12V), H20 (V20L), H38 (R39K), H69 (M69I), H76 (S76N), H78 (V78A), H80 (M80L), H81 (E81Q), H92 (C92S) и H93 (A93T).

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 вариабельной области упомянутый первым остаток представляет собой остаток человека, а в пределах CDR упомянутый первым остаток представляет собой остаток мыши.

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

В настоящем изобретении предложены варианты гуманизированного антитела 7G6, в которых гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%,

96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu7G6-VH_v1 и hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO: 139-140), и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7 и hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO: 141-148). В некоторых таких антителах сохраняется по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или все 17 из обратных мутаций или других мутаций, обнаруженных в SEQ ID NO: 139-140 и SEQ ID NO: 141-148.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

каждая из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности зародышевой линии человека $\geq 85\%$. Участки CDR таких гуманизированных антител 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 могут являться идентичными или по существу идентичными участкам CDR 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6, соответственно.

Участки CDR можно определить согласно любому общепринятому определению (например, Чотиа или сводному определению Чотиа и Кэбота), но, предпочтительно, они определены согласно определению Кэбота.

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

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

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

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

Д. Химерные и венированные антитела.

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

Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые вариабельные 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.

Венированное антитело представляет собой тип гуманизированного антитела, который сохраняет некоторые и обычно все из CDR и некоторые из каркасных остатков вариабельной области, отличных от остатков человека, антитела, отличного от антитела человека, но в котором другие каркасные остатки вариабельной 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 вариабельной области антитела, отличного от антитела человека, являются более подобными человеку благодаря заменам. Венированные формы антител 5G8, 6A10, 8A4 и 7G6 включены в настоящее изобретение.

Е. Антитела человека.

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

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

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

Е. Выбор константной области.

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

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 No. 5,624,821; Tso et al., патент США No. 5,834,597; и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), или для увеличения периода полужизни у человека (см., например, публикацию Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Иллюстративные замены включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428 (в данном абзаце для константной области используется нумерация EU) для увеличения периода полужизни антитела. Замена в любом или всех положениях 234, 235, 236 и/или 237 снижает аффинность в отношении рецепторов Fcγ, в частности, рецептора FcγRI (см., например, US 6,624,821). Замену аланина в положениях 234, 235 и 237 IgG1 человека можно применять для снижения эффекторных функций. Некоторые антитела содержат замену аланина в положениях 234, 235 и 237 IgG1 человека для снижения эффекторных функций. Необязательно, положения 234, 236 и/или 237 в IgG2 человека замещены аланином, а положение 235 - глутамином (см., например, публикацию US 5,624,821). В некоторых антителах применяют мутацию в одном или нескольких из положений 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331 IgG1 человека согласно нумерации EU. В некоторых антителах применяют мутацию в одном или нескольких из положений 318, 320 и 322 IgG1 человека согласно нумерации EU. В некоторых антителах положения 234 и/или 235 замещены аланином, и/или положение 329 замещено глицином. В некоторых антителах положения 234 и 235 замещены аланином. В некоторых антителах изотип представляет собой IgG2 или IgG4 человека.

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

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 гиромизину, 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 полиадактирования 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 № 5,741,957; патент США № 5,304,489; и патент США № 5,849,992). Подходящие трансгены включают кодирующие последовательности для легкой и/или тяжелой цепей, функционально связанные с промотором и энхансером из гена, специфичного к молочной железе, такого

как казеин или бета-лактоглобулин.

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

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

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 СНО или улучшение титров белков (см., например, публикации US 5,786,464; US 6,114,148; US 6,063,598; US 7,569,339; W02004/050884; W02008/012142; W02008/012142; W02005/019442; W02008/107388; W02009/027471; и US 5,888,809).

IV. Активные иммуногены.

В настоящем изобретении также предложены способы лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания у субъекта, причем указанные способы включают введение средства, вызывающего иммунный ответ против тау. Такое средство, применяемое для активной иммунизации, выступает для индукции у пациента тех же типов антитела, как описано выше применительно к пассивной иммунизации. Некоторые такие способы включают введение субъекту иммуногена, содержащего эпитоп, с которым специфично связывается антитело 5G8, в режиме, эффективном для образования антител против тау. В некоторых способах иммуноген содержит пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO: 3, с которым специфично связывается антитело 5G8. В других способах вводят иммуноген, содержащий эпитоп, с которым специфично связывается антитело 6A10. В некоторых способах иммуноген содержит пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO: 3, с которым специфично связывается антитело 6A10. В некоторых способах вводят иммуноген, содержащий эпитоп, с которым специфично связывается антитело 8A4. В некоторых способах иммуноген содержит пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO: 3, с которым специфично связывается антитело 8A4. В других способах вводят иммуноген, содержащий эпитоп, с которым специфично связывается антитело 7G6. В некоторых способах вводят иммуноген, содержащий эпитоп, с которым специфично связывается антитело 3D6. В некоторых способах иммуноген содержит пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO: 3, с которым специфично связывается антитело 3D6. В некоторых способах вводят иммуноген, содержащий пептид тау, состоящий из до 20 смежных аминокислот SEQ ID NO: 3, причем по меньшей мере два из антител 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 и 3D6 специфично связываются с пептидом тау. В некоторых способах иммуноген содержит эпитоп, с которым специфично связывается более одного из вышеупомянутых антител, причем указанный эпитоп состоит из пептида длиной 4-11 смежных аминокислот из остатков 199-213 SEQ ID NO: 3 или остатков 262 - 276 SEQ ID NO: 3, или длиной 4-11 смежных аминокислот из остатков 199 - 213 SEQ ID NO: 3 и остатков 262 - 276 SEQ ID NO: 3. В некоторых способах эпитоп пептида тау состоит из 4 -11 смежных аминокислот из остатков 199 - 213 SEQ ID NO: 3 или из остатков 262 - 276 SEQ ID NO: 3. В других способах эпитоп пептида тау состоит из двух смежных сегментов аминокислот: одного сегмента из остатков 199-213 SEQ ID NO: 3, другого - из остатков 262 - 276 SEQ ID NO: 3, причем два смежных сегмента в сумме состоят из 4 - 11 аминокислот.

Для индукции антител, связывающихся с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 или 3D6, можно картировать специфичность эпитопа для данных антител (например, посредст-

вом 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 токسينа. Т-клеточные эпитопы также являются подходящими молекулами-носителями. Некоторые конъюгаты могут быть образованы посредством связывания средств согласно настоящему изобретению с иммуностимулирующей полимерной молекулой (например, трипальмитоил-S-глицерин цистеином (Pam₃Cys), маннаном (полимером маннозы) или глюканом (β 1→2 полимер)), цитокинами (например, ИЛ-1, альфа-и β -пептидами ИЛ-1, ИЛ-2, γ -ИФН, ИЛ-10, ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором)) и хемокинами (например, MIP1- α и β , и RANTES). Иммуногены могут быть соединены с носителями посредством спейсерных аминокислот (например, gly-gly) или без них. Дополнительные носители включают вирусоподобные частицы. Вирусоподобные частицы (ВПЧ), также называемые псевдовирионами 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 Класа II, такому как универсальный DR-эпитоп ("PADRE"). PADRE описан в публикациях US 5,736,142, WO 95/07707 и Alexander J et al., Immunity, 1:751-761 (1994). Активные иммуногены могут быть представлены в мультимерной форме, в которой множество копий иммуногена и/или его носителя представлены в виде одной ковалентной молекулы.

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 (MPL™) (см. GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Гамильтон, Монтана, сейчас часть Corixa). Stimulon™ 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 5,057,540), (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)), плурониковые полимеры и убитые микобактерии. Адъюванты Ribi представляют собой эмульсии "масло в воде". Ribi содержит метаболизируемое масло (сквален), эмульгированное с солевым раствором, содержащим Tween 80. Ribi также содержит очищенные микобактериальные продукты, 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 (ретропептид). 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 не-медленно-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 венецуэльского энцефалита лошадей (см. US 5,643,576) и рабдовирусы, такие как вирус везикулярного стоматита (см. WO 96/34625) и папилломавирусы (Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629 и Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

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

Н. Скрининговые анализы антител.

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, N.Y., Lewis, et al., *Nat Genet.* 25:402-405 (2000)). Данные мыши характеризуются более ступенчатым течением нейродегенерации. У мышей развиваются нейрофибриллярные клубки в нескольких 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 манифеста-

ция 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 агента обычно проводят в сочетании с контролем, в котором проводят параллельный эксперимент, за исключением того, что антитело или активный агент отсутствует (например, заменены наполнителем). Затем снижение, отсрочивание или ингибирование признаков или симптомов заболевания, вызываемое антителом или активным агентом, исследование которого проводят, можно оценить по сравнению с контролем.

V. Пациенты, поддающиеся лечению.

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

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), гиперхолестеринемии 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 ре-

дакция, 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: 7-8, 47-48, 49-50, 51-52, 53-54, 55, 59). Например, SEQ ID NO: 9 кодирует аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи 5G8 мыши SEQ ID NO: 47, и SEQ ID NO: 10 кодирует аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи 5G8 мыши SEQ ID NO: 48. Необязательно, такие нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, и их можно экспрессировать с сигнальным пептидом, присоединенным к константной области. Кодирующие последовательности нуклеиновых кислот могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, таких как промотор, энхансер, сайт связывания рибосомы, сигнал терминации транскрипции и т.п. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи, могут существовать в выделенной форме либо их можно клонировать в одном или нескольких векторах. Нуклеиновые кислоты можно синтезировать посредством, например, твердофазного синтеза или 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 С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП); для ингибирования или снижения агрегации тау; ингибирования или снижения образования волокон тау; снижения или устранения отложений тау; стабилизации нетоксичных конформаций тау; или лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, легкого когнитивного нарушения, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитического паркинсонизма, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерного паралича, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофического латерального склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП) у пациента. Например, такие антитела можно конъюгировать с другими терапевтическими агентами, другими белками, другими антителами и/или обнаруживаемыми метками. См. публикации WO 03/057838; US 8,455,622. Такие терапевтические агенты могут представлять собой любое средство, которое можно применять для лечения, борьбы, облегчения, предотвращения или улучшения нежелательного состояния или заболевания у пациента, такого как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкое когнитивное нарушение, первичная возрастная таупатия, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП).

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 со-

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

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

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 Hazza et al., *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Присоединение радиоактивных изотопов серебра может включать восстановление иммуноглобулина аскорбиновой кислотой. Для радиоактивных изотопов, таких как ¹¹¹In и ⁹⁰Y, можно применять ибритутумаб тиуксетан, который будет вступать в реакцию с такими изотопами с образованием ¹¹¹In-ибритутумаба тиуксетана и ⁹⁰Y-ибритутумаба тиуксетана, соответственно. См. публикацию Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

Некоторые такие антитела можно присоединить к другим терапевтическим агентам. Такие терапевтические агенты могут являться, например, цитотоксическими, цитостатическими, нейротрофическими или нейропротекторными. Например, антитела можно конъюгировать с токсичными химиотерапевтическими лекарственными средствами, такими как майтансин, гелданамицин, ингибиторы тубулина, такие как средства, связывающие тубулин (например, 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, кортико-базальной 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 от-

личным 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, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианта болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), и/или для оценки эффективности лечения. Такие антитела являются в особенности подходящими для осуществления такого определения у субъектов, которые страдают от или предрасположены к болезни Альцгеймера, синдрому Дауна, легким когнитивным нарушениям, первичной возрастной таупатии, постэнцефалитическому паркинсонизму, посттравматической деменции или деменции боксеров, болезни Пика, болезни Ниманна-Пика типа С, надъядерному параличу, лобно-височной деменции, лобно-височной лобарной дегенерации, болезни аргирофильных зерен, глобулярной глиальной таупатии, амиотрофическому латеральному склерозу/комплексу паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальной дегенерации (КБД), деменции с тельцами Леви, варианту болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующему надъядерному параличу (ПНП), или в соответствующих биологических образцах, полученных от таких субъектов. Типичные обнаруживаемые метки, которые можно объединить с антителом или присоединить к антителу, включают различные ферменты, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как люминол; биолюминесцентные материалы, такие как люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, такие как радиоактивное серебро-111, радиоактивное серебро-199, бисмут-²¹³, иод (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ^mIn), 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 ибритутумаб тиуксетан, который будет вступать в реакцию с такими изотопами с образованием ¹¹¹In-ибритутумаба тиуксетана и ⁹⁰Y-ибритутумаба тиуксетана, соответственно. См. публикацию Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95(2001).

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

VI. Фармацевтические композиции и способы применения.

При профилактических вариантах применения антитело или средство для индукции антитела или фармацевтическую композицию, содержащую указанные антитело или средство, вводят пациенту, расположенному 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 антитела 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 средства, 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 инъецируют непосредственно в конкретную ткань, в которой накопились отложения, например, посредством внутричерепной инъекции.

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

ми.

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, 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, внутриаириальным, внутривисерпным, 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 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6 мыши, гуманизированное, химерное или венированное антитело 5G8, 6A10, 8A4 или 7G6), пациенту, а затем посредством обнаружения средства после его связывания. Клирингового ответа на введенные антитела можно избежать или его можно снизить с применением фрагментов антитела, в которых отсутствует полноразмерная константная область, таких как Fab. В некоторых способах одно и то же антитело может выступать в качестве реактива как для лечения, так и для диагностики.

Диагностические реактивы можно вводить посредством внутривенной инъекции в организм пациента либо непосредственно в головной мозг с помощью внутривисерпной 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 забо-

леванию. Например, способы можно применять в отношении пациента, у которого наблюдаются симптомы деменции. Если у пациента присутствуют аномальные нейрофибрилярные клубки, тогда пациент, вероятно, страдает от болезни Альцгеймера. В качестве альтернативы, если у пациента присутствуют аномальные включения тау, тогда, в зависимости от расположения включений, пациент может страдать от лобно-височной лобарной дегенерации. Способы можно также применять в отношении бессимптомных пациентов. Присутствие отложений аномального тау-белка свидетельствует о предрасположенности к последующему симптоматическому заболеванию. Способы также являются подходящими для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение у пациентов, у которых ранее было диагностировано связанное с тау заболевание.

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

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

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 шести месяцев до десяти лет, предпочтительно, 1-5 лет. У некоторых пациентов профилактическое сканирование проводят ежегодно. Если сканирование ПЭТ, проведенное в качестве профилактической меры, свидетельствует об аномально высоких уровнях отложений тау-белка, можно начинать применение иммунотерапии и

проводить последующие сканирования ПЭТ, как для пациентов, у которых была диагностирована таупатия. Если сканирование ПЭТ, проведенное в качестве профилактической меры, свидетельствует об уровнях отложений тау-белка в пределах нормы, можно проводить последующие сканирования ПЭТ с интервалами от шести месяцев до десяти лет, 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 значений таких областей. Суммарный эффект лечения можно приблизительно вычислить посредством добавления процента снижения по сравнению с исходным уровнем к повышению отложений тау-белка, которое в противном случае произойдет у среднего не получавшего лечение пациента.

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

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 скле-

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

VII. Наборы.

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 другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

VIII. 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 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз 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, посттравмати-

ческая деменция или деменция боксеров, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височная деменция, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь аргирофильных зерен, глобулярная глиальная таупатия, амиотрофический латеральный склероз/комплекс паркинсонизм-деменция Гуам, кортико-базальная дегенерация (КБД), деменция с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD) или прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП). 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, кортико-базальная 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, кортико-базальной 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 по-

нимания, будет очевидно, что некоторые изменения и модификации могут быть произведены в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Идентификация моноклональных антител против тау.

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

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

Пример 2. Моноклональные антитела мыши связываются с тау в анализах ELISA.

Способы: Непрямой ELISA: 96-луночные полистирольные планшеты сенсibilизировали захватывающими антителами против 6xHis (фиг. 1А) или поликлональными антителами против тау (Dako №A0024, фиг. 1В), суспендированными в 1х ФБР, в течение 2 ч при к.т. (комнатной температуре) или 16 ч при температуре 4°C. Нанесенный материал удаляли, и планшеты блокировали в течение 1 часа 1% БСА в 1х ФБР с последующей инкубацией с рекомбинантным тау человека с полигистидиновой меткой на N-конце белка (фиг. 1А) или без нее (фиг. 1В). После промывки планшеты инкубировали с указанными антителами, промывали и инкубировали с конъюгированным с ПХ (пероксидазой хрена) вторичным антителом козы против иммуноглобулинов мыши. Реакцию в планшетах запускали добавлением ТМВ, и A_{450} измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов.

Сэндвич-ELISA: 96-луночные полистирольные планшеты сенсibilизировали антителами против иммуноглобулинов мыши в 1х ФБР в течение 2 ч при к.т. или 16 ч при температуре 4°C. Нанесенный материал удаляли, и планшеты блокировали в течение 1 часа 1% БСА в 1х ФБР. Затем планшеты инкубировали с указанными антителами в идентичных концентрациях, разведенными в 0,1% БСА в 1х ФБР. Планшеты последовательно обрабатывали тау человека, поликлональными антителами кролика против тау (Dako №A0024) и конъюгированным с ПХ антителом козы против иммуноглобулинов кролика, все из которых были разведены в 0,1% БСА в ФБР, с промывками между каждым этапом. Добавляли стрептавидин-ПХ, реакцию в планшетах запускали добавлением ТМВ, и A_{450} измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов. См. фиг. 1С.

Результаты: панель продуцированных гибридомой антител анализировали в отношении связывания с тау с помощью нескольких различных форматов ELISA. Обнаружение тау подтверждали с применением непрямого формата, с применением тау-белка, иммобилизованного посредством его слитой с N-концом полигистидиновой метки (фиг. 1А). Также подтверждали связывание с нативным немеченым белком (фиг. 1В). Для оценки аффинности различных антител в растворе использовали формат сэндвич-ELISA, в котором исследуемые антитела гибридомы применяли в качестве захватывающих реактивов (фиг. 1С).

Пример 3. Аффинность моноклональных антител мыши в отношении тау.

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

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

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

Способы: ингибирование связывания тау с клетками нейробластомы B103 с помощью моноклональных антител против тау.

1. Клетки B103 ресуспендировали в ФБР в концентрации 5×10^5 клеток/мл. В планшет MSD High

Bind высевали по 50 мкл суспензии клеток на лунку. Получали концентрацию 25К клеток/лунку. Планшет накрывали, и позволяли клеткам присоединиться при температуре 37°C, 5% CO₂, в течение 2 ч.

2. После присоединения клеток из лунок удаляли ФБР посредством переворачивания планшета и аккуратного постукивания для удаления избытка буфера. В каждую лунку добавляли 50 мкл 3% Блокатора А MSD в ФБР или другого подходящего блокирующего буфера и инкубировали планшет при к.т. в течение 1 часа без встряхивания.

3. В течение этапа блокирования планшета совместно инкубировали тау и антитела против тау следующим образом:

а. Начинали с антитела против тау в концентрации 2 мг/мл и готовили серийные разведения в ФБР, в соотношении 1:2, для 7 дополнительных разведений.

б. Разводили тау в ФБР до концентрации 20 нМ. Концентрация тау в каждой лунке являлась постоянной.

с. Перемешивали тау и антитело против тау в соотношении 1:1 до конечной концентрации тау 10 нМ и начальной концентрации антитела против тау 1 мг/мл.

д. Инкубировали смесь в течение приблизительно 1 ч при к.т. при встряхивании (600 об./мин.).

4. После блокирования планшета, этап 2, из лунок удаляли блокирующий буфер посредством переворачивания планшета и аккуратного постукивания и дважды промывали планшет ФБР с применением многоканальной пипетки. Убеждались, что избыток буфера был полностью удален. Перед добавлением комплексов тау: антитело против тау охлаждали высевные клетки до температуры 4°C.

5. К высевным клеткам добавляли 50 мкл охлажденного комплекса, этап 3, и инкубировали на льду в течение 30 минут.

6. Дважды промывали планшет охлажденным ФБР, как описано ранее.

7. Добавляли 50 мкл 16B5.SULFO-TAG на лунку для обнаружения связанного с поверхностью клеток тау. Инкубировали на льду в течение 30 минут.

8. Снова дважды промывали планшет охлажденным ФБР, как описано ранее.

9. Добавляли 150 мкл на лунку 1X буфера для считывания Т без поверхностно-активного вещества (разведенного в H₂O) и незамедлительно проводили считывание на приборе MSD SECTOR™ 600. Избежали образования пузырьков при добавлении буфера для считывания.

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

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

Результаты.

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

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

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

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

Пример 6. Дизайн гуманизированных антител 5G8.

Исходной точкой или донорным антителом для гуманизации являлось антитело 5G8 мыши. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи зрелого m5G8 представлена в виде SEQ ID NO: 9. Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи зрелого m5G8 представлена в виде SEQ ID NO: 10. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно сводному определению Кэбота/Чотиа представлены в виде SEQ ID NO: 11-13, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи согласно Кэботу

представлены в виде SEQ ID NO: 14-16, соответственно. Везде применяют нумерацию Кэбота.

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

Последовательности VH и VL 5G8 использовали для поискового запроса в организованной базе данных антител программного обеспечения BioLuminate (Schrödinger, LLC; Zhu K, et al., (2014) *Proteins*. 82(8): 1646-1655) в отношении белков с подобными аминокислотными последовательностями и известными структурами. Структуру антитела 3F4 мыши против прионов с высокой степенью подобия (PDB ID: 1CR9; 1CR9_H; SEQ ID NO: 27 и 1CR9_L; SEQ ID NO: 30), обнаруженного Kascsak, et al. ((1987) *J Virol.* 61(12):3688-93) и секвенированного Kanyo, et al. ((1999). *J Mol Biol.* 293(4):855-63.), с разрешением 2,9 Å, выбрали для использования в качестве матрицы с целью построения модели 5G8 в BioLuminate. Последующий поисковый запрос в базе данных BioLuminate в отношении антител, полученных от человека, позволил обнаружить, что каркасные участки VH и VL 5G8 характеризуются высокой степенью подобия последовательности с соответствующими участками областей VH и VL гуманизированного Fab против дабигатрана aDabi-Fab2b (учетный № VH: 4YHM_H); учетный № VL: 4YHM_L), сконструированного Schiele, et al. ((2015) *MAbs.* 7(5):871-80). Варибельные домены 5G8 и aDabi-Fab2b также характеризовались идентичными длинами CDR-H1, H2, петель L1, L2 и L3. Соответственно, каркасные участки VH (учетный № 4YHM_H; SEQ ID NO: 28) и VL aDabi-Fab2b (учетный №. 4YHM_L; SEQ ID NO: 31) были выбраны в качестве акцепторных последовательностей для CDR 5G8.

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

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

определяют конформации канонических CDR (обобщены в публикации Martin 2010)

находятся в зоне Верньера (Foote J and Winter G. (1992) *Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops*. *J Mol Biol.* 224(2):487-99),

локализуются к поверхности взаимодействия домена VH/VL (обобщено в публикации Léger OJP and Saldanha J. (2000) *Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanization by CDR grafting*. In: Shepherd P and Dean C (eds). *Monoclonal Antibodies: a Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press),

способны подвергаться посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование или пироглутаминирование,

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

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

Конструировали 8 вариантов гуманизированной варибельной области тяжелой цепи и 6 вариантов гуманизированной варибельной области легкой цепи, содержащие различные пермутации замен 8 ил-

люстративных гуманизированных зрелых вариабельных областей тяжелой цепи: hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7 и hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO: 33-40, соответственно) и hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5 и hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO: 41-46, соответственно), (табл. 4 и 3). Иллюстративные дизайны гуманизированных V_k и V_h с обратными мутациями и другими мутациями на основе отобранных каркасных участков человека представлены в табл. 6 и 7, соответственно. Выделенные жирным шрифтом области в табл. 6 и 7 отмечают CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа. "." в столбцах в табл. 6 в случае hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5 и hu5G8-VL_v6 указывает, что аминокислота в указанном положении является такой же, как и в hu5G8-VL_v1. "." в столбцах в табл. 7 в случае hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7 и hu5G8-VH_v8 указывает, что аминокислота в указанном положении является такой же, как и в hu5G8-VH_v1. "-" в столбцах в табл. 6 и 7 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO: 33-40 и SEQ ID NO: 41-46 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в табл. 8. Аминокислоты в положениях в hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7 и hu5G8-VH_v8 перечислены в табл. 9. Аминокислоты в положениях в hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5 и hu5G8-VL_v6 перечислены в табл. 10. Процент степени гуманизации для гуманизированных цепей VH hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7 и hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO: 33-40, соответственно) по сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGHV1-46 и для гуманизированных цепей VL hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5 и hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO: 41-46, соответственно) по сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGV2-29 представлен в табл. 11.

Таблица 6

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

24	24	CDR-L1	K	K	R	K	.	.	.	.	.
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
29	27B	CDR-L1	L	L	I	L	.	.	.	.	.
30	27C	CDR-L1	L	L	V	L	.	.	.	.	.
31	27D	CDR-L1	D	H	H	D	.	.	.	.	.
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
33	27F	CDR-L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	28	CDR-L1	D	D	D	D	.	.	.	.	.
35	29	CDR-L1	G	G	G	G	.	.	.	.	.
36	30	CDR-L1	K	K	N	K	.	.	.	.	.
37	31	CDR-L1	T	T	I	T	.	.	.	.	.
38	32	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
39	33	CDR-L1	L	L	L	L	.	.	.	.	.
40	34	CDR-L1	N	Y	E	N	.	.	.	.	.
41	35	Fr2	W	W	W	W	.	.	.	.	.
42	36	Fr2	L	Y	Y	Y	L	L	L	.	L
43	37	Fr2	L	L	L	L	.	.	.	.	.
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
45	39	Fr2	R	K	K	K	.	.	.	.	.
46	40	Fr2	P	P	P	P	.	.	.	.	.
47	41	Fr2	G	G	G	G	.	.	.	.	.
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
49	43	Fr2	S	S	S	S	.	.	.	.	.
50	44	Fr2	P	P	P	P	.	.	.	.	.
51	45	Fr2	K	Q	K	K	.	.	.	Q	Q
52	46	Fr2	R	L	L	L	R	R	R	.	R
53	47	Fr2	L	L	L	L	.	.	.	.	.
54	48	Fr2	I	I	I	I	.	.	.	.	.
55	49	Fr2	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
56	50	CDR-L2	L	E	K	L	.	.	.	.	.
57	51	CDR-	V	V	V	V	.	.	.	.	.

		L2									
58	52	CDR-L2	S	S	S	S	.	.	.	.	.
59	53	CDR-L2	K	S	Y	K	.	.	.	.	.
60	54	CDR-L2	L	R	R	L	.	.	.	.	.
61	55	CDR-L2	D	F	F	D	.	.	.	.	.
62	56	CDR-L2	S	S	S	S	.	.	.	.	.
63	57	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
64	58	Fr3	V	V	V	V	.	.	.	.	.
65	59	Fr3	P	P	P	P	.	.	.	.	.
66	60	Fr3	D	D	D	D	.	.	.	.	.
67	61	Fr3	R	R	R	R	.	.	.	.	.
68	62	Fr3	F	F	F	F	.	.	.	.	.
69	63	Fr3	T	S	S	S	.	.	.	.	.
70	64	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
71	65	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.
72	66	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
73	67	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.
74	68	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
75	69	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.
76	70	Fr3	D	D	G	G	.	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F	.	.	.	.	.
78	72	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.
79	73	Fr3	L	L	L	L	.	.	.	.	.
80	74	Fr3	K	K	K	K	.	.	.	.	.
81	75	Fr3	I	I	I	I	.	.	.	.	.
82	76	Fr3	R	S	S	S	.	.	.	.	.
83	77	Fr3	R	R	R	R	.	.	.	.	.
84	78	Fr3	V	V	V	V	.	.	.	.	.
85	79	Fr3	E	E	E	E	.	.	.	.	.
86	80	Fr3	A	A	A	A	.	.	.	.	.
87	81	Fr3	E	E	E	E	.	.	.	.	.
88	82	Fr3	D	D	D	D	.	.	.	.	.
89	83	Fr3	L	V	V	V	.	.	.	.	.
90	84	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
91	85	Fr3	V	V	V	V	.	.	.	.	.
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
94	88	Fr3	C	C	C	C	.	.	.	.	.
95	89	CDR-L3	W	M	F	W	.	.	.	.	.
96	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
97	91	CDR-L3	G	-	A	G	.	.	.	.	.
98	92	CDR-L3	T	-	S	T	.	.	.	.	.
99	93	CDR-L3	L	-	H	L	.	.	.	.	.

		L3									
100	94	CDR-L3	F	-	V	F	.	.	.	.	.
101	95	CDR-L3	P	-	P	P	.	.	.	.	.
102	95A	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	95B	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	95C	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	95D	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	95E	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	95F	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	96	CDR-L3	Y	G	Y	Y	.	.	.	.	.
109	97	CDR-L3	T	I	T	T	.	.	.	.	.
110	98	Fr4	F	H	F	F	.	.	.	.	.
111	99	Fr4	G	L	G	G	.	.	.	.	.
112	100	Fr4	G	P	G	G	.	.	.	.	.
113	101	Fr4	G		G	G	.	.	.	.	.
114	102	Fr4	T		T	T	.	.	.	.	.
115	103	Fr4	K		K	K	.	.	.	.	.
116	104	Fr4	L		L	L	.	.	.	.	.
117	105	Fr4	E		E	E	.	.	.	.	.
118	106	Fr4	I		I	I	.	.	.	.	.
119	106A	Fr4	-		-	-	-	-	-	-	-
120	107	Fr4	K		K	K	.	.	.	.	.

Таблица 7

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

26	26	CDR-H1	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
27	27	CDR-H1	F	Y	Y	F	.	.	.	.	.	.	.
28	28	CDR-H1	N	T	T	N	.	.	.	.	.	.	.
29	29	CDR-H1	I	F	F	I	.	.	.	.	.	.	.
30	30	CDR-H1	K	T	T	K	.	.	.	.	.	.	.
31	31	CDR-H1	D	S	D	D	.	.	.	.	.	.	.
32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
34	34	CDR-H1	M	M	M	M	.	.	.	.	.	.	.
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	.	.	.	.	.	.	.
36	35A	CDR-H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	35B	CDR-H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	36	Fr2	W	W	W	W	.	.	.	.	.	.	.
39	37	Fr2	V	V	V	V	.	.	.	.	.	.	.
40	38	Fr2	R	R	R	R	.	.	.	.	.	.	.
41	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.	.	.
42	40	Fr2	R	A	A	A	.	.	.	.	.	.	.
43	41	Fr2	P	P	P	P	.	.	.	.	.	.	.
44	42	Fr2	E	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
45	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.	.	.
46	44	Fr2	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
47	45	Fr2	L	L	L	L	.	.	.	.	.	.	.
48	46	Fr2	E	E	E	E	.	.	D	D	D	.	D
49	47	Fr2	W	W	W	W	.	.	.	.	.	.	.
50	48	Fr2	I	M	M	M	I	I	I	I	I	.	I
51	49	Fr2	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
52	50	CDR-H2	W	I	E	W	.	.	.	.	.	.	.
53	51	CDR-H2	I	I	T	I	.	.	.	.	.	.	.
54	52	CDR-H2	D	N	N	D	.	.	.	.	.	.	.
55	52A	CDR-H2	P	P	P	P	.	.	.	.	.	.	.
56	52B	CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	52C	CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

58	53	CDR-H2	E	S	R	E	.	.	.	.	.	.	.
59	54	CDR-H2	N	G	N	N	.	.	.	.	.	.	.
60	55	CDR-H2	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
61	56	CDR-H2	D	S	G	D	.	.	.	.	.	.	.
62	57	CDR-H2	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
63	58	CDR-H2	V	S	T	V	.	.	.	.	.	.	.
64	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
65	60	CDR-H2	A	A	N	A	.	.	.	.	.	.	.
66	61	CDR-H2	P	Q	E	P	.	.	.	.	.	.	.
67	62	CDR-H2	K	K	K	K	.	.	.	.	.	.	.
68	63	CDR-H2	F	F	F	F	.	.	.	.	.	.	.
69	64	CDR-H2	Q	Q	K	Q	.	.	.	.	.	.	.
70	65	CDR-H2	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
		H2											
71	66	Fr3	K	R	K	K	.	.	.	.	.	R	R
72	67	Fr3	A	V	A	A	.	.	.	.	.	V	V
73	68	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
74	69	Fr3	M	M	M	M	.	.	.	.	.	.	.
75	70	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
76	71	Fr3	S	R	R	R	S	S	S	S	S	.	S
77	72	Fr3	D	D	D	D	.	.	.	.	.	.	.
78	73	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
79	74	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
80	75	Fr3	S	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
81	76	Fr3	N	S	S	S	.	.	.	N	N	.	.
82	77	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
83	78	Fr3	A	V	A	A	.	.	.	.	.	V	V
84	79	Fr3	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
85	80	Fr3	L	M	M	M	.	.	.	L	L	.	.
86	81	Fr3	H	E	E	E	.	.	.	.	.	.	.
87	82	Fr3	L	L	L	L	.	.	.	.	.	.	.
88	82A	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
89	82B	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
90	82C	Fr3	L	L	L	L	.	.	.	.	.	.	.
91	83	Fr3	T	R	R	R	.	.	.	.	.	.	.
92	84	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
93	85	Fr3	E	E	E	E	.	.	.	.	.	.	.
94	86	Fr3	D	D	D	D	.	.	.	.	.	.	.

95	87	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
96	88	Fr3	A	A	A	A	.	.	.	.	.	.	.
97	89	Fr3	V	V	V	V	.	.	.	.	.	.	.
98	90	Fr3	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
99	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
100	92	Fr3	C	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.
101	93	Fr3	S	A	T	T	S	S	S	S	S	A	S
102	94	Fr3	P	R	I	I	P	P	P	P	P	R	P
103	95	CDR-H3	L		G	L	.	.	.	.	.	.	.
104	96	CDR-H3	-		T	-	-	-	-	-	-	-	-
105	97	CDR-H3	-		S	-	-	-	-	-	-	-	-
106	98	CDR-H3	-		G	-	-	-	-	-	-	-	-
107	99	CDR-H3	-		Y	-	-	-	-	-	-	-	-
108	100	CDR-H3	-		D	-	-	-	-	-	-	-	-
109	100A	CDR-H3	-		Y	-	-	-	-	-	-	-	-
110	100B	CDR-H3	-		F	-	-	-	-	-	-	-	-
111	100C	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
		H3											
112	100D	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	100E	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	100F	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
115	100G	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
116	100H	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	100I	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	100J	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
119	100K	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	101	CDR-H3	D		D	D	.	.	.	.	.	.	.
121	102	CDR-H3	F		Y	F	.	.	.	.	.	.	.
122	103	Fr4	W		W	W	.	.	.	.	.	.	.
123	104	Fr4	G		G	G	.	.	.	.	.	.	.
124	105	Fr4	Q		Q	Q	.	.	.	.	.	.	.
125	106	Fr4	G		G	G	.	.	.	.	.	.	.

126	107	Fr4	T		T	T	.	.	.	.	.	.	.
127	108	Fr4	T		L	L	.	.	.	.	.	.	.
128	109	Fr4	L		V	V	.	.	.	.	.	.	.
129	110	Fr4	T		T	T	.	.	.	.	.	.	.
130	111	Fr4	V		V	V	.	.	.	.	.	.	.
131	112	Fr4	S		S	S	.	.	.	.	.	.	.
132	113	Fr4	S		S	S	.	.	.	.	.	.	.

Таблица 8
Обратные мутации и другие мутации V_H, V_L для гуманизированного 5G8

Вариант V _H или V _L	Экзон акцепторной последовательности V _H или V _L	Изменения по сравнению с остатками акцепторного каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа)
hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	Отсутствуют
hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H48, H71, H93, H94
hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H48, H71, H93, H94
hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H46, H48, H71, H93, H94
hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93, H94
hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H11, H12, H19, H20, H23, H46, H48, H71, H76, H80, H93, H94
hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H66, H67, H78, H93, H94
hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H46, H48, H66, H67, H71, H78, H93, H94
hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	отсутствуют
hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	L2, L36, L46
hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)	Акцепторный aDabi-Fab2b-VL, учетн. №4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	L2, L36, L46, L70
hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	L2, L7, L17, L36, L46, L70

	31)	
hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	L45, L70
hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учетн. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	L2, L36, L45, L46, L70

Таблица 9

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

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	VH 5G8 мыши (SEQ ID NO: 7)	hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)	hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)	hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)	hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)	hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)	hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)	hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)	hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)
H1	Q	E	Q	Q	E	E	E	E	Q	E
H11	V	L	V	V	V	V	L	L	V	V
H12	K	V	K	K	K	K	V	V	K	K
H19	K	R	K	K	K	K	R	R	K	K
H20	V	L	V	V	V	V	L	L	V	V
H23	K	T	K	K	K	K	K	A	K	K
H46	E	E	E	E	E	D	D	D	E	D
H48	M	I	M	I	I	I	I	I	M	I
H66	K	K	K	K	K	K	K	K	R	R
H67	A	A	A	A	A	A	A	A	V	V
H71	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S
H76	S	N	S	S	S	S	N	N	S	S
H78	A	A	A	A	A	A	A	A	V	V
H80	M	L	M	M	M	M	L	L	M	M
H93	T	S	T	S	S	S	S	S	A	S
H94	I	P	I	P	P	P	P	P	R	P

Таблица 10

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

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор aDabi-Fab2b-VL, учет. № 4YHM_L (SEQ ID NO: 31)	VL 5G8 мыши (SEQ ID NO: 8)	hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO: 41)	hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO: 42)	hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO: 43)	hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO: 44)	hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO: 45)	hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO: 46)
L2	I	V	I	V	V	V	I	V
L7	T	T	T	T	T	S	T	T
L17	Q	Q	Q	Q	Q	E	Q	Q
L36	Y	L	Y	L	L	L	Y	L
L45	K	K	K	K	K	K	Q	Q
L46	L	R	L	R	R	R	L	R
L70	G	D	G	G	D	D	D	D

Таблица 11

Процент степени гуманизации тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител 5G8

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

Положения, в которых остатки канонического класса Чотиа, верньерные остатки или остатки поверхности взаимодействия/остатки упаковки отличаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами для замены. Примеры остатков канонического класса Чотиа включают остатки L2, L27B, L27C, L34, L94, H29, H71 и H94 согласно Кэботу в табл. 3 и 4. Примеры верньерных остатков включают остатки L2, L36, L46, H27, H28, H29, H30, H48, H71, H78, H93 и H94 согласно Кэботу в табл. 3 и 4. Примеры остатков поверхности взаимодействия/остатков упаковки (VH+VL) включают остатки L34, L36, L46, L89, L91, H93 и H95 согласно Кэботу в табл. 3 и 4.

Основания для выбора положений, указанных в табл. 6 в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими. L2 (I2V) представляет собой обратную мутацию канонического остатка и верньерного остатка.

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

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

L36 (Y36L) представляет собой обратную мутацию верньерного остатка и остатка поверхности вза-

имодействия.

L45 (K45Q) представляет собой мутацию к остатку зародышевой линии IGKV2-29.

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

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

Основания для гуманизированных вариантов, указанных в табл. 6 в варибельной области легкой цепи, являются следующими.

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

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

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

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

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

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

Основания для выбора положений, указанных в табл. 7 в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

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

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

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

H19 (K19R) представляет собой обратную мутацию. R часто встречается в данном положении у людей.

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

H23 (K23A) представляет собой мутацию к остатку, который часто встречается в данном положении у людей.

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

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

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

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

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

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

H78 (A78V) представляет собой мутацию к остатку зародышевой линии IGHV1-46.

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

H93 (T93S или T93A) T93S представляет собой обратную мутацию верньерного остатка и остатка поверхности взаимодействия. T93A представляет собой мутацию к остатку зародышевой линии IGHV1-46. T и S редко встречаются в данном положении у людей. А наиболее часто встречается в данном положении у людей.

H94 (I94P или I94R) I94P представляет собой обратную мутацию канонического и верньерного остатка. I94R представляет собой мутацию к остатку зародышевой линии IGHV1-46. I и P редко встречаются в данном положении у людей. P наиболее часто встречается в данном положении у людей.

Основания для гуманизированных вариантов, указанных в табл. 7 в вариабельной области тяжелой цепи, являются следующими.

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

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

Hu5G8-VH_v3 содержит обратные мутации hu5G8-VH-v2 и дополнительно восстанавливает замену каркасного участка в положении 1 согласно Кэботу. На N-конце белков как E, так и Q, как известно, спонтанно циклизируются с образованием пироглутамата; однако конверсия E происходит более медленно, чем Q (Liu YD, et al., (2011) J Biol Chem. 286(13): 11211-7.; Schilling S, et al., (2008) Biol Chem. 389(8):983-91). Hu5G8-VH-v3 содержит обратную мутацию Q1E для снижения пироглутаминирования.

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

Hu5G8-VH_v5 содержит мутации hu5G8-VH-v4 и дополнительно восстанавливает все замены каркасного участка в положениях, в которых родительская аминокислота 5G8-VH мыши более распространена в секвенированных антителах человека по сравнению с остатком aDabi-Fab2b-VH. В положениях 11, 12, 19, 20, 76 и 80 согласно Кэботу остаток 5G8-VH является более распространенным в антителах человека, чем остаток aDabi-Fab2b-VH. Hu5G8-VH_v5 содержит обратные мутации V11L, K12V, K19R, V20L, S76N и M80L, которые восстанавливают родительские каркасные остатки 5G8-VH, одновременно увеличивая степень гуманизации последовательности.

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

- положение 66: R встречается наиболее часто; aDabi-Fab2b-VH (K) и 5G8-VH (K);
- положение 67: V встречается наиболее часто; aDabi-Fab2b-VH (A) и 5G8-VH (A);
- положение 93: A встречается наиболее часто; aDabi-Fab2b-VH (T) и 5G8-VH (S); и
- положение 94: R встречается наиболее часто; aDabi-Fab2b-VH (I) и 5G8-VH (P).

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

Hu5G8-VH_v7 содержит мутации K66R, A67V, A78V, T93A и I94R в качестве другой стратегии увеличения степени гуманизации последовательности.

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

восстановление всех замен в каркасном участке в положениях, которые являются ключевыми для определения канонических классов Чотиа, являются частью зоны Верньера или локализируются к поверхности взаимодействия доменов VH/VL (обратные мутации M48I, R71S, A93S и R94P),

восстановление замены в каркасном участке в положении 1 согласно Кэботу для снижения пироглутаминирования (обратная мутация Q1E), и введение мутаций в каркасные остатки, которые, как предсказывает программное обеспечение BioLuminate, препятствуют CDR (консервативная мутация E46D).

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

Вариабельные области тяжелой цепи

> 5G8-VH (SEQ ID NO: 7)

EVQLQQSGAELVRSGASVRLSCTASGFNIKDYMHVVRQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
VYAPKFQ GKATMTSDTSSNTAYLHLSLTS EDTAVYYCSPLDFW GQGTTLT VSS

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

KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIYQWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGNSE
YAPRFQ GKATMTADTSLNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNADLHDYWGQGTTLT VSS

>aDabi-Fab2b-VH, учетный № 4YHM_H (SEQ ID NO:28)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHVVRQAPGQGLEWMGETNPRNG
GTTYNEKFKGKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTIGTSGYDYFDYWGQGT
LTVSS

>IGHV1-46, учетный № P01743.2 (SEQ ID NO:29)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGS
TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR

> hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO: 33)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENG
 DTVYAPKFQGKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTILDFWGQGTLLTVSS

> hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLEWIGWIDPENGD
 TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

> hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO: 35)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLEWIGWIDPENGD
 TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

> hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
 TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

> hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
 TVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

> hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCAASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
 TVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

> hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO: 39)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENG
 DTVYAPKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARLDFWGQGTLLTVSS

> hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
 TVYAPKFQGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

Вариабельные области легкой цепи каппа

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

DVVMQTQPLTSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKIRRVEAEDLVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

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

DVVMQTQPLTSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLIWVFQRPQGSPKRLIFLVSKRDS
GVVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTPHTVGGGTKLEIA

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

DIVMTQTPLTSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSDGNIYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSRYFS
GVVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHVPYTFGGGTKLEIK

>IGKV2-29, учетный № A2NVJ5.2 (SEQ ID NO:32)

DIVMTQTPLTSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVSSRFS
GVVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLP

> hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)

DIVMTQTPLTSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWYLQKPGQSPKLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

> hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)

DVVMQTQPLTSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

> hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)

DVVMQTQPLTSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

> hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)

DVVMQTSPLTSLSVTPGEPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

> hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)

DIVMTQTPLTSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

> hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)

DVVMQTQPLTSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

Пример 7. Дизайн гуманизированных антител 6A10.

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

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

263:800-815.]. CDR-H1 из 10 остатков принадлежит к классу 1, CDR-H2 из 17 остатков -классу 1 [Martin & Thornton, 1996]. CDR-H3 не имеет канонических классов.

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

Проводили поиск среди белковых последовательностей в базе данных PDB [Deshpande N. et al., (2005) *Nucleic Acids Res.* 33: D233-D237.] для обнаружения структур, которые обеспечат грубую структурную модель 6A10. Для структуры Vk использовали кристаллическую структуру fab антитела [код pdb 1CR9; SEQ ID NO:30] [Kanyo Z.F. et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:855-863.], поскольку она характеризовалась высоким разрешением (2,0 Å) и общим подобием последовательности Vk 6A10 с сохранением тех же канонических структур для петель. Ту же структуру [код pdb 1CR9; SEQ ID NO: 27] использовали для структуры Vh, поскольку она характеризовалась высоким общим подобием последовательности и достаточно хорошим разрешением (2,0 Å). Помимо этого, CDR-H1 и H2 характеризуются теми же каноническими структурами, что и Vh 6A10. Для моделирования грубой структуры 6A10 использовали программное обеспечение Bioluminate. Данное программное обеспечение было лицензировано компанией Schrodinger Inc.

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

Конструировали 3 варианта гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи и 3 варианта гуманизированной вариабельной области легкой цепи, содержащие различные пермутации замен, hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2 и hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO: 85-87, соответственно) и hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2 и hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO: 88-90, соответственно) (табл. 12 и 13). Иллюстративные дизайны гуманизированных VL и VH с обратными мутациями и другими мутациями на основе отобранных каркасных областей человека представлены в табл. 12 и 13, соответственно. Выделенные жирным шрифтом области в табл. 12 и 13 отмечают CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа. "-" в столбцах в табл. 12 и 13 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO: 85-87 и SEQ ID NO: 88-90 содержат обратные мутации и другие мутации, как представлено в табл. 14. Аминокислоты в положениях в hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2 и hu6A10-VH_v3 перечислены в табл. 15. Аминокислоты в положениях в hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2 и hu6A10-VL_v3 перечислены в табл. 16. Процент степени гуманизации для гуманизированных цепей VH hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2 и hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO: 85-87, соответственно) по сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 82), а также для гуманизированных цепей VL hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2 и hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO: 88-90, соответственно) по сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 84) представлен в табл. 17.

Таблица 12

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

21	21	Fr1	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	R	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S	S
29	27B	CDR-L1	L	L	L	L	L
30	27C	CDR-L1	L	V	L	L	L
31	27D	CDR-L1	D	Y	D	D	D
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S	S
33	27F	CDR-L1	–	–	–	–	–
34	28	CDR-L1	D	D	D	D	D
35	29	CDR-L1	G	G	G	G	G
36	30	CDR-L1	K	N	K	K	K
37	31	CDR-L1	T	T	T	T	T
38	32	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
39	33	CDR-L1	L	L	L	L	L
40	34	CDR-L1	N	N	N	N	N
41	35	Fr2	W	W	W	W	W
42	36	Fr2	L	F	F	F	F
43	37	Fr2	L	Q	Q	Q	Q
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
45	39	Fr2	R	R	R	R	R
46	40	Fr2	P	P	P	P	P
47	41	Fr2	G	G	G	G	G
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q

49	43	Fr2	S	S	S	S	S
50	44	Fr2	P	P	P	P	P
51	45	Fr2	K	R	R	R	R
52	46	Fr2	R	R	R	L	L
53	47	Fr2	L	L	L	L	L
54	48	Fr2	I	I	I	I	I
55	49	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
56	50	CDR-L2	L	K	L	L	L
57	51	CDR-L2	V	V	V	V	V
58	52	CDR-L2	S	S	S	S	S
59	53	CDR-L2	K	N	K	K	K
60	54	CDR-L2	L	R	L	L	L
61	55	CDR-L2	D	D	D	D	D
62	56	CDR-L2	S	S	S	S	S
63	57	Fr3	G	G	G	G	G
64	58	Fr3	V	V	V	V	V
65	59	Fr3	P	P	P	P	P
66	60	Fr3	D	D	D	D	D
67	61	Fr3	R	R	R	R	R
68	62	Fr3	F	F	F	F	F
69	63	Fr3	T	S	S	S	S
70	64	Fr3	G	G	G	G	G
71	65	Fr3	S	S	S	S	S
72	66	Fr3	G	G	G	G	G
73	67	Fr3	S	S	S	S	S
74	68	Fr3	G	G	G	G	G
75	69	Fr3	T	T	T	T	T

76	70	Fr3	D	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F	F
78	72	Fr3	T	T	T	T	T
79	73	Fr3	L	L	L	L	L
80	74	Fr3	K	K	K	K	K
81	75	Fr3	I	I	I	I	I
82	76	Fr3	S	S	S	S	S
83	77	Fr3	R	R	R	R	R
84	78	Fr3	V	V	V	V	V
85	79	Fr3	E	E	E	E	E
86	80	Fr3	A	A	A	A	A
87	81	Fr3	E	E	E	E	E
88	82	Fr3	D	D	D	D	D
89	83	Fr3	L	V	V	V	V
90	84	Fr3	G	G	G	G	G
91	85	Fr3	V	V	V	V	V
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
94	88	Fr3	C	C	C	C	C
95	89	CDR-L3	W	M	W	W	W
96	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
97	91	CDR-L3	G	G	G	G	G
98	92	CDR-L3	T	T	T	T	T
99	93	CDR-L3	H	H	H	H	H
100	94	CDR-L3	F	R	F	F	F
101	95	CDR-L3	P	P	P	P	P
102	95A	CDR-L3	–	–	–	–	–
103	95B	CDR-L3	–	–	–	–	–

104	95C	CDR-L3	–	–	–	–	–
105	95D	CDR-L3	–	–	–	–	–
106	95E	CDR-L3	–	–	–	–	–
107	95F	CDR-L3	–	–	–	–	–
108	96	CDR-L3	Y	L	Y	Y	Y
109	97	CDR-L3	T	T	T	T	T
110	98	Fr4	F	F	F	F	F
111	99	Fr4	G	G	G	G	G
112	100	Fr4	G	G	G	G	G
113	101	Fr4	G	G	G	G	G
114	102	Fr4	T	T	T	T	T
115	103	Fr4	K	K	K	K	K
116	104	Fr4	L	V	V	V	V
117	105	Fr4	E	E	E	E	E
118	106	Fr4	I	I	I	I	I
119	106A	Fr4	–	–	–	–	–
120	107	Fr4	K	K	K	K	K

Таблица 13

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

27	27	CDR-H1	L	Y	L	L	L
28	28	CDR-H1	N	T	N	N	N
29	29	CDR-H1	I	F	I	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	K	K	K
31	31	CDR-H1	D	G	D	D	D
32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	I	M	I	I	I
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	H
36	35A	CDR-H1	–	–			
37	35B	CDR-H1	–	–			
38	36	Fr2	W	W	W	W	W
39	37	Fr2	V	V	V	V	V
40	38	Fr2	K	R	R	R	R
41	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
42	40	Fr2	R	A	A	A	A
43	41	Fr2	P	P	P	P	P

44	42	Fr2	E	G	G	G	G
45	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
46	44	Fr2	G	G	G	G	G
47	45	Fr2	L	L	L	L	L
48	46	Fr2	E	E	E	E	E
49	47	Fr2	W	W	W	W	W
50	48	Fr2	I	M	M	I	I
51	49	Fr2	G	G	G	G	G
52	50	CDR-H2	W	W	W	W	W
53	51	CDR-H2	I	I	I	I	I
54	52	CDR-H2	D	N	D	D	D
55	52A	CDR-H2	P	P	P	P	P
56	52B	CDR-H2	—	—			
57	52C	CDR-H2	—	—			
58	53	CDR-H2	E	N	E	E	E
59	54	CDR-H2	N	S	N	N	N
60	55	CDR-H2	D	G	D	D	D
61	56	CDR-	D	D	D	D	D

		H2					
62	57	CDR-H2	T	T	T	T	T
63	58	CDR-H2	E	N	E	E	E
64	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y
65	60	CDR-H2	A	A	A	A	A
66	61	CDR-H2	P	Q	P	P	P
67	62	CDR-H2	K	K	K	K	K
68	63	CDR-H2	F	F	F	F	F
69	64	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q
70	65	CDR-H2	G	G	G	G	G
71	66	Fr3	R	R	R	R	R
72	67	Fr3	A	V	V	V	V
73	68	Fr3	T	T	T	T	T
74	69	Fr3	L	T	T	T	I
75	70	Fr3	T	T	T	T	T
76	71	Fr3	T	R	R	R	R
77	72	Fr3	D	D	D	D	D
78	73	Fr3	T	T	T	T	T
79	74	Fr3	S	S	S	S	S

80	75	Fr3	S	I	I	I	I
81	76	Fr3	N	S	S	S	S
82	77	Fr3	T	T	T	T	T
83	78	Fr3	A	A	A	A	A
84	79	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
85	80	Fr3	L	M	M	M	L
86	81	Fr3	Q	E	E	E	E
87	82	Fr3	L	L	L	L	L
88	82A	Fr3	S	S	S	S	S
89	82B	Fr3	S	R	R	R	R
90	82C	Fr3	L	L	L	L	L
91	83	Fr3	T	R	R	R	R
92	84	Fr3	S	S	S	S	S
93	85	Fr3	E	D	D	D	D
94	86	Fr3	D	D	D	D	D
95	87	Fr3	T	T	T	T	T
96	88	Fr3	A	A	A	A	A
97	89	Fr3	V	V	V	V	V
98	90	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
99	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
100	92	Fr3	C	C	C	C	C
101	93	Fr3	T	A	A	A	A
102	94	Fr3	P	R	R	R	R
103	95	CDR-H3	L	L	L	L	L
104	96	CDR-	–	A	–	–	

		H3					
105	97	CDR-H3	–	A	–	–	
106	98	CDR-H3	–	R	–	–	
107	99	CDR-H3	–	P	–	–	
108	100	CDR-H3	–	L	–	–	
109	100A	CDR-H3	–		–	–	
110	100B	CDR-H3	–		–	–	
111	100C	CDR-H3	–		–	–	
112	100D	CDR-H3	–		–	–	
113	100E	CDR-H3	–	–	–	–	
114	100F	CDR-H3	–	–	–	–	
115	100G	CDR-H3	–	–	–	–	
116	100H	CDR-H3	–	–	–	–	
s 117	100I	CDR-H3	–	–	–	–	

118	100J	CDR-H3	–	–	–	–	
119	100K	CDR-H3	–	–	–	–	
120	101	CDR-H3	D	D	D	D	D
121	102	CDR-H3	Y	Y	Y	Y	Y
122	103	Fr4	W	W	W	W	W
123	104	Fr4	G	G	G	G	G
124	105	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
125	106	Fr4	G	G	G	G	G
126	107	Fr4	T	T	T	T	T
127	108	Fr4	S	L	L	L	L
128	109	Fr4	V	V	V	V	V
129	110	Fr4	T	T	T	T	T
130	111	Fr4	V	V	V	V	V
131	112	Fr4	S	S	S	S	S
132	113	Fr4	S	S	S	S	S

Таблица 14

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

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

Таблица 15

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

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

Таблица 16

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

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

Таблица 17

Процент степени гуманизации тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител 6A10

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

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

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

Основания для выбора положений, указанных в табл. 12 в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими. R46L: представляет собой остаток поверхности взаимодействия и, как правило, представляет собой L.

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

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

Варибельные области легкой цепи:

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

DVVMQTPTLTLSTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTTFPPTFGGGTKLEIK

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

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTTHRPLTFGGGKVEIK

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

DVVMQTPTLSLSTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLIWVFQRPQGSPKRLIFLVSKRDS
GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTFPHTVGGGKLEIA

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

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTTHWPLTFGGGKVEIK

>hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFGGGKVEIK

>hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFGGGKVEIK

>hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)

DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFGGGKVEIK

Основания для выбора положений, указанных в табл. 13 в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

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

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

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

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

Вариабельные области тяжелой цепи:

Аминокислотная последовательность зрелой области VH m6A10 (SEQ ID NO: 63)

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYYIHVVKQRPEQGLEWIGWIDPENDDTE
YAPKFQGRATLTDTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCTPLDYWGQGTSTVTVSS

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

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSG
DTNYAQKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLAARPLDYWGQGTSLVTVSS

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

KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGNSE
YAPRFQGKATMTADTLSTAYLQLSSLTSEDYAVYYCNADLHDYWGQGTTLTVSS

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSG
GTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSRRGYDFWSGSPEDY
WGQGTSLVTVSS

>hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGLNIKDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENDD
TEYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTSLVTVSS

>hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGLNIKDYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDPENDDT
EYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTSLVTVSS

>hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)

QVQLQESGAEVKKPGGSVKVSKASGLNIKDYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDPENDDT
EYAPKFQGRVTITRDTSTAYLELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTSLVTVSS

Пример 8. Дизайн гуманизированных антител 8A4.

Исходной точкой для гуманизации моноклонального антитела 8A4 являлось антитело 8A4 мыши. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи зрелого 8A4 представлена в виде SEQ ID NO: 91. Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи зрелого 8A4 представлена в виде SEQ ID NO: 92. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно сводному определению Кэбота/Чотиа представлены в виде SEQ ID NO: 93-95, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи согласно Кэботу представлены в виде SEQ ID NO: 96-98, соответственно. Везде применяют нумерацию Кэбота.

Выравнивание последовательностей вариабельной области 8A4 с консенсусными последовательностями вариабельных областей антитела из публикации Kabat, et al. (Kabat EA, Wu TT, Foeller C, Perry HM, Gottesman KS. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th edition). Bethesda, MD: National Institutes of Health) свидетельствует, что вариабельная область тяжелой цепи (VH) 8A4 принадлежит к подгруппе 2с VH мыши, которая соответствует подгруппе 1 VH человека. Вариабельная область легкой цепи каппа (VL) 8A4 принадлежит к подгруппе 2 Vk мыши, которая соответствует подгруппе 2 Vk человека.

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

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

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

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

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

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

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

Остатки на поверхности взаимодействия между доменами Vk и Vh являются остатками, которые

часто обнаруживают, за исключением того, что 93S в тяжелой цепи, как правило, представляет собой аланин; вследствие этого данный остаток анализируют в качестве мишени для обратной мутации. Аналогично, 36L в Vk, как правило, представляет собой Y или F, вследствие этого данный остаток также анализируют в отношении обратных мутаций. Дополнительно, CRD3 легкой цепи содержит неспаренный остаток цистеина.

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

Поиск в неизбыточной базе данных белковых последовательностей от NCBI позволил провести отбор подходящих каркасных участков человека, в которые переносили CDR мыши. Для Vk выбрали вариабельную область легкой цепи каппа человека с учетным № ABA26100 [SEQ ID NO: 112; Rabquer, B.J., et al., 2016; *Differential variable gene usage between pneumococcal polysaccharide specific B cells isolated 5-10 days and 4-6 weeks post-vaccination*. Не опубликована]. Данная последовательность характеризуется теми же каноническими классами для CDR-L1 и L2, что и VL 8A4 мыши, и является членом подгруппы 2 согласно Кэботу каппа человека. Для Vh выбрали вариабельную область тяжелой цепи человека с учетным № ADU57742 [SEQ ID NO: 110; Lantto, J., et al., 2011 *J. Virol.* 85: 1820-1833]; данная последовательность характеризуется теми же каноническими классами, что и VH 8A4 мыши, и является членом подгруппы 1 согласно Кэботу тяжелой цепи человека.

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

Таблица 18

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

27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S	S
29	27B	CDR-L1	L	L	L	L	L
30	27C	CDR-L1	L	V	L	L	L
31	27D	CDR-L1	D	Y	D	D	D
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S	S
	27F	CDR-L1	-	-			
33	28	CDR-L1	D	D	D	D	D
34	29	CDR-L1	G	G	G	G	G
35	30	CDR-L1	K	S	K	K	K
36	31	CDR-L1	T	T	T	T	T
37	32	CDR-L1	Y	W	Y	Y	Y
38	33	CDR-L1	L	L	L	L	L
39	34	CDR-L1	N	N	N	N	N
40	35	Fr2	W	W	W	W	W
41	36	Fr2	L	F	F	F	L
42	37	Fr2	L	Q	Q	Q	Q
43	38	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
44	39	Fr2	R	R	R	R	R
45	40	Fr2	P	P	P	P	P
46	41	Fr2	G	G	G	G	G
47	42	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
48	43	Fr2	S	S	S	S	S
49	44	Fr2	P	P	P	P	P
50	45	Fr2	K	R	R	R	R
51	46	Fr2	R	R	R	R	R

52	47	Fr2	L	L	L	L	L
53	48	Fr2	I	I	I	I	I
54	49	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
55	50	CDR-L2	L	D	L	L	L
56	51	CDR-L2	V	V	V	V	V
57	52	CDR-L2	S	S	S	S	S
58	53	CDR-L2	K	T	K	K	K
59	54	CDR-L2	L	R	L	L	L
60	55	CDR-L2	D	D	D	D	D
61	56	CDR-L2	S	S	S	S	S
62	57	Fr3	G	G	G	G	G
63	58	Fr3	V	V	V	V	V
64	59	Fr3	P	P	P	P	P
65	60	Fr3	D	D	D	D	D
66	61	Fr3	R	R	R	R	R
67	62	Fr3	F	F	F	F	F
68	63	Fr3	T	S	S	S	S
69	64	Fr3	G	G	G	G	G
70	65	Fr3	S	S	S	S	S
71	66	Fr3	G	G	G	G	G
72	67	Fr3	S	S	S	S	S
73	68	Fr3	G	G	G	G	G
74	69	Fr3	T	T	T	T	T
75	70	Fr3	D	D	D	D	D
76	71	Fr3	F	F	F	F	F
77	72	Fr3	T	T	T	T	T

78	73	Fr3	L	L	L	L	L
79	74	Fr3	K	K	K	K	K
80	75	Fr3	I	I	I	I	I
81	76	Fr3	S	S	S	S	S
82	77	Fr3	R	R	R	R	R
83	78	Fr3	V	V	V	V	V
84	79	Fr3	E	E	E	E	E
85	80	Fr3	A	A	A	A	A
86	81	Fr3	E	E	E	E	E
87	82	Fr3	D	D	D	D	D
88	83	Fr3	L	V	V	V	V
89	84	Fr3	G	G	G	G	G
90	85	Fr3	V	V	V	V	V
91	86	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
92	87	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
93	88	Fr3	C	C	C	C	C
94	89	CDR-L3	W	M	W	W	W
95	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
96	91	CDR-L3	G	F	G	G	G
97	92	CDR-L3	T	I	T	T	T
98	93	CDR-L3	H	D	H	H	H
99	94	CDR-L3	F	W	F	F	F
100	95	CDR-L3	P	P	P	P	P
	95A	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95B	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95C	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95D	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95E	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95F	CDR-L3	-	-	-	-	-
101	96	CDR-L3	C	H	C	C	C
102	97	CDR-L3	T	T	T	T	T
103	98	Fr4	F	F	F	F	F
104	99	Fr4	G	G	G	G	G
105	100	Fr4	G	Q	Q	Q	Q
106	101	Fr4	G	G	G	G	G
107	102	Fr4	T	T	T	T	T
108	103	Fr4	K	K	K	K	K
109	104	Fr4	L	L	L	L	L
110	105	Fr4	E	E	E	E	E
111	106	Fr4	I	I	I	I	I
	106A	Fr4	-	-	-	-	-
112	107	Fr4	K	K	K	K	K

Таблица 19

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 8A4 мыш (SEQ ID NO:91)	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
1	1	Fr1	E	Q	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	V	V
13	13	Fr1	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	S	S	G	G
17	17	Fr1	L	S	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	V	V	L	L
21	21	Fr1	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	G	F	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	N	N	N
29	29	CDR-H1	I	F	I	I	I
30	30	CDR-H1	K	S	K	K	K

31	31	CDR-H1	D	S	D	D	D
32	32	CDR-H1	Y	N	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	P	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	I	V	I	I	I
35	35	CDR-H1	H	S	H	H	H
	35A	CDR-H1	-	-	-	-	-
	35B	CDR-H1	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	R	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	M	M	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	G	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I
52	52	CDR-H2	D	I	D	D	D
53	52A	CDR-H2	P	P	P	P	P
	52B	CDR-H2	-	-	-	-	-
	52C	CDR-H2	-	-	-	-	-
54	53	CDR-H2	E	F	E	E	E

55	54	CDR-H2	N	A	N	N	N
56	55	CDR-H2	G	Q	G	G	G
57	56	CDR-H2	D	K	D	D	D
58	57	CDR-H2	T	V	T	T	T
59	58	CDR-H2	V	L	V	V	V
60	59	CDR-H2	Y	G	Y	Y	Y
61	60	CDR-H2	D	A	D	D	D
62	61	CDR-H2	P	Q	P	P	P
63	62	CDR-H2	Q	R	Q	Q	Q
64	63	CDR-H2	F	V	F	F	F
65	64	CDR-H2	Q	R	Q	Q	Q
66	65	CDR-H2	D	D	D	D	D
67	66	Fr3	K	R	R	R	R
68	67	Fr3	A	I	I	I	A
69	68	Fr3	N	N	N	T	T
70	69	Fr3	I	I	I	I	I
71	70	Fr3	T	T	T	T	T
72	71	Fr3	A	A	A	A	A
73	72	Fr3	D	D	D	D	D
74	73	Fr3	T	T	T	T	T
75	74	Fr3	S	S	S	S	S
76	75	Fr3	S	T	T	T	T
77	76	Fr3	N	S	S	S	S
78	77	Fr3	T	T	T	T	T
79	78	Fr3	A	A	A	A	A
80	79	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
81	80	Fr3	L	M	M	M	M
82	81	Fr3	Q	E	E	E	E

83	82	Fr3	L	L	L	L	L
84	82A	Fr3	S	S	S	S	S
85	82B	Fr3	S	G	G	G	G
86	82C	Fr3	L	L	L	L	L
87	83	Fr3	T	R	R	R	R
88	84	Fr3	S	S	S	S	S
89	85	Fr3	E	D	D	D	E
90	86	Fr3	G	D	D	D	D
91	87	Fr3	T	T	T	T	T
92	88	Fr3	A	A	A	A	A
93	89	Fr3	V	V	V	V	V
94	90	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
95	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
96	92	Fr3	C	C	C	C	C
97	93	Fr3	S	A	S	S	A
98	94	Fr3	T	T	T	T	T
99	95	CDR-H3	L	G	L	L	L
	96	CDR-H3	-	Q	-	-	-
	97	CDR-H3	-	Q	-	-	-
	98	CDR-H3	-	L	-	-	-
	99	CDR-H3	-	Y	-	-	-
	100	CDR-H3	-	S	-	-	-
	100A	CDR-H3	-	L	-	-	-
	100B	CDR-H3	-		-	-	-
	100C	CDR-H3	-		-	-	-
	100D	CDR-H3	-		-	-	-
	100E	CDR-H3	-		-	-	-
	100F	CDR-H3	-		-	-	-
	100G	CDR-H3	-		-	-	-
	100H	CDR-H3	-		-	-	-
	100I	CDR-H3	-		-	-	-
	100J	CDR-H3	-		-	-	-
	100K	CDR-H3	-		-	-	-
100	101	CDR-H3	D	H	D	D	D
101	102	CDR-H3	F	Y	F	F	F
102	103	Fr4	W	W	W	W	W
103	104	Fr4	G	G	G	G	G
104	105	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
105	106	Fr4	G	G	G	G	G
106	107	Fr4	T	T	T	T	T
107	108	Fr4	T	L	L	L	L
108	109	Fr4	L	V	V	V	V
109	110	Fr4	T	T	T	T	T
110	111	Fr4	V	V	V	V	V
111	112	Fr4	S	S	S	S	S
112	113	Fr4	S	S	S	S	S

Таблица 20
Обратные мутации и другие мутации V_H, V_L для гуманизированного 8A4

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

Таблица 21

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

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № ADU57742 (SEQ ID NO:110)	VH 8A4 мыши (SEQ ID NO: 91)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
H12	K	V	K	V	V
H16	S	A	S	G	G
H20	V	L	V	L	L
H48	M	I	M	M	I
H67	I	A	I	I	A
H68	N	N	N	T	T
H85	D	E	D	D	E
H93	A	S	S	S	A

Таблица 22

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

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

Таблица 23

Процент степени гуманизации тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител 8A4

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

Положения, в которых остатки канонического класса Чотиа, верньерные остатки или остатки поверхности взаимодействия/остатки упаковки отличаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами для замены. Примеры остатков канонического класса Чотиа включают остатки H24, H26, H29, H34, H54, H55, H71, H94, L2, L25, L27B, L27C, L29, L33, L34, L71, L90, L94, L95 и L97 согласно Кэботу в табл. 18 и 19 и у. Примеры верньерных остатков включают остатки H2, H27, H28, H29, H30, H47, H48, H49, H67, H69, H71, H73, H78, H93, H94, H103, L2, L4, L35, L36, L46, L47, L48, L49, L64, L66, L68, L69, L71 и L98 согласно Кэботу в табл. 18 и 19. Примеры остатков поверхности взаимодействия/остатков упаковки (VH+VL) включают остатки H35, H37, H39, H45, H47, H91, H93, H95, H103, L34, L36, L38, L44, L46, L87, L89, L91, L96 и L98 согласно Кэботу в табл. 18 и 19.

Основания для выбора положений, указанных в табл. 18 в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

I2V представляет собой обратную мутацию канонического и верньерного остатка.

Q17E представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку Q редко встречается в каркасном участке в данном положении у людей, а E встречается наиболее часто.

F36L представляет собой обратную мутацию остатка поверхности взаимодействия и верньерного остатка.

Варибельные области легкой цепи:

зрелая область VL 8A4 мыши (SEQ ID NO: 92)

DVVMQTPLTSLVITIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSKLD

SGVPDRFTGSGSGDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHTFPCTFGGGTKLEIK

3JAUVL (SEQ ID NO: 111)

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVIYYCYQGSHVPYTFGGGTKLEIK

ABA26100 (SEQ ID NO: 112)

DVMTSSSVTGASSCRSSSVYSDGSTWNWRGSRRYDVSTRDSGVDRSGSGSGTDTKSRV
ADVGVIYYCMDWHTGGTKK

IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 84)

DIVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYYCWQGHFPTFGQGTKLEIK

hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO: 116)

DIVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYYCWQGHFPTFGQGTKLEIK

hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO: 117)

DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYYCWQGHFPTFGQGTKLEIK

hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO: 118)

DVVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYYCWQGHFPTFGQGTKLEIK

Основания для выбора положений, указанных в табл. 19 в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

K12V представляет собой обратную мутацию и мутацию на основе частоты, поскольку V встречается часто в данном положении в каркасном участке у людей.

S16G представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку G встречается наиболее часто в данном положении.

V20L представляет собой обратную мутацию и мутацию на основе частоты, поскольку L встречается наиболее часто в данном положении.

M48I представляет собой обратную мутацию верньерного остатка.

I67A представляет собой обратную мутацию верньерного остатка.

N68T представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку T встречается наиболее часто в данном положении.

D85E представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку E встречается наиболее часто в данном положении в каркасном участке у людей. A93S представляет собой обратную мутацию в hu8A4-VHv1 и hu8A4VH-v2 верньерного остатка и остатка поверхности взаимодействия для сохранения упаковки CDR. В hu8A4VH-v3 положение согласно Кэботу представляет собой A, поскольку A встречается наиболее часто в данном положении, а S встречается редко.

Вариабельные области тяжелой цепи:

Зрелая область VH 8A4 мыши (SEQ ID NO: 91)

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
VYDPQFQDKANITADTSSNTAYLQLSSLTSEGTAVYYCSTLDFWGGGTLTVSS

3JAUVH (SEQ ID NO: 109)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGKIDPANGNTK
YDPKFQDKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCANSNYWFDYWGQGTTLTVS
S

ADU57742 (SEQ ID NO: 110)

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSNPVSWVRQAPGQGLEWMGGIIPFAQKV
LGAQRVDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCATGQQLYSLHYWGQGTTLTV
SS

IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 82)

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT
TVYDPQFQDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGGGTLTVSS

hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO: 113)

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT
TVYDPQFQDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGGGTLTVSS

hu8A4-VH_v2: (SEQ ID NO: 114)

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT
TVYDPQFQDRITITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGGGTLTVSS

hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO: 115)

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDPENGDT
VYDPQFQDRATITADTSTSTAYMELSGLRSEDTAVYYCATLDFWGGGTLTVSS

Пример 9. Дизайн гуманизированных антител 7G6.

Исходной точкой для гуманизации моноклонального антитела 7G6 являлось антитело 7G6 мыши. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи зрелого 7G6 представлена в виде SEQ ID NO: 119. Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи зрелого 7G6 представлена в виде SEQ ID NO: 120. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи согласно сводному определению Кэбота/Чотиа представлены в виде SEQ ID NO: 121-123, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи согласно Кэботу представлены в виде SEQ ID NO: 124-126, соответственно. Везде применяют нумерацию Кэбота.

Выравнивание последовательностей вариабельной области 7G6 с консенсусными последовательностями вариабельных областей антитела из публикации Kabat, et al. [Kabat EA, Wu TT, Perry H, Gottesman K, Foeller C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242] свидетельствует, что вариабельная область тяжелой цепи (VH) 7G6 принадлежит к подгруппе 2с VH мыши, которая соответствует подгруппе 1 VH человека. Вариабельная область легкой цепи (VL) каппа 7G6 принадлежит к подгруппе 2 Vk мыши, которая соответствует подгруппе 2 Vk человека.

CDR VH и VL 7G6 идентифицировали с применением правил Мартина для идентификации CDR на основании последовательности [Martin AC, Thornton JM. (1996) Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modeling and application to antibodies. J Mol Biol. 263:800-15.]. CDR относили к каноническим классам Чотиа с применением краткой характеристики ключевых остатков, представленной в табл. 3.5 публикации Martin:

CDR-H1 состоит из 7 аминокислот и подобен каноническому классу Чотиа 1.

CDR-H2 состоит из 6 аминокислот и подобен каноническому классу Чотиа 2.

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

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

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

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

Основания для гуманизации переменного домена иммуноглобулина 7G6 Антитело мыши Prothema-7G6 (далее именуемое просто 7G6) гуманизировали, исходя из матрицы акцепторного антитела человека, обозначенного как 3U0T [La Porte, S.L., et al., (2012) J. Mol. Biol. 421: 525-536] в банке данных белков RCSB. Данную матрицу антитела идентифицировали в результате антитело-специфичного поиска последовательности по гомологии, ограниченного остатками переменного домена VL (1-110) и VH (1-114). При поиске по гомологии применяли программное обеспечение BioLuminate, версия 3.1, выпускная версия 2018-1 компании Schrodinger. Данное программное обеспечение сравнивает последовательность целевого антитела (7G6) с организованной Schrodinger базой данных последовательностей переменного домена человека и мыши, для которых были опубликованы кристаллические структуры белка высокого качества.

Выбор матрицы антитела человека.

Антитело-матрицу 3U0T [3U0T_VH SEQ ID NO: 127; 3U0T_VL SEQ ID NO: 138], которое характеризовалось разрешением 2,5 ангстрем, идентифицировали в группе подобных антител человека, которые характеризовались идентичностью или подобием аминокислотной последовательности более 80% с 7G6 в соответствующих переменных доменах VH и VL, а также имели кристаллическую структуру с разрешением ниже 3,0 ангстрем. Некоторые другие антитела в данной группе включали (по коду pdb): 4YVG, 6BOG, 4KY1, 5T2T, 4HCR и 5K9O. 3U0T было выбрано благодаря высокой гомологии последовательности с 7G6 в положениях поверхности взаимодействия VH/VL, пронумерованных согласно Кэботу. VH [35,37,39,45,47,89,91,93] и VL[44,45,46,47,48,49]. Среди данных остатков поверхности взаимодействия 7G6 и 3U0T различаются только в VL-45 (R по сравнению с K) и VH-93 (T по сравнению с A). Общая гомология переменного домена в определенных согласно Чотиа каркасных участках представлена в табл. 24. (В каркасном участке Чотиа, в отличие от Кэбота, CDR-H2 оканчивается в положении 58).

Таблица 24

Гомология последовательности между переменными доменами 7G6 и 3U0T

Домен	Общее количество остатков каркасного участка	Идентичные	Подобные	Отличающиеся
VL	81	7	6	5
VH	89	62	13	14

Подобные аминокислоты группируют по полярности и заряду, ароматичности, гидрофобности или объему и форме, например: (I,L,M,V), (S,T), (F,Y), (E,Q,D,N). VL характеризуется идентичностью или подобием в каркасном участке более 93%, и VH характеризуется идентичностью или подобием в каркасном участке более 84%. Дальнейшая проверка позволила выявить высокую степень гомологии для очень длинного CDR-1 легкой цепи. Из 20 остатков 17 являются идентичными, а 2 являются различными: (D,Y) в VL-7D и (G,A) в VL-29. Вследствие этого кристаллическая структура 3U0T должна обеспечить превосходный образец для формы CDR L-1.

Иллюстративными различиями между 7G6 и 3U0T являются:

Остаток 89-W в VL 7G6. Данный остаток находится в пределах поверхности взаимодействия VL/VH, где он заменяет F из 3U0T. Исходное структурное моделирование с предсказанием антител с помощью BioLuminate позволило получить структуры, в которых W89 содержит один из двух ротамеров боковой цепи. $\chi_1=0$ или 90 градусов. В ротамере $\chi_1=0$ W89 размещается перпендикулярно к поверхности взаимодействия VL/VH. В данном положении W89 способствует образованию дна антиген-связывающего кармана и обладает потенциалом для образования вандерваальсового контакта как с CDR-H3 (в особенности, Leu-95 в VH), так и с несколькими из консервативных остатков, которые иным способом образуют поверхность взаимодействия VL/VH. В ротамере $\chi_1=180$ боковая цепь триптофана ориентируется параллельно поверхности взаимодействия VH/VL; в результате она не будет осуществлять контакт с CDR-H3, но будет осуществлять вандерваальсовы контакты с несколькими другими консервативными остатками, которые образуют поверхность взаимодействия VH/VL. В иллюстративных гуманизированных вариантах VL 7G6 используют ориентацию Trp $\chi_1=0$. В настоящем изобретении также предусмотрена мутация других каркасных аминокислот, которые осуществляют вандерваальсовы контакты с W89 в ориентации $\chi_1=90$, но не $\chi_1=0$.

В высокой степени консервативный цистин в положении 92H согласно Кэботу является практически повсеместным в укладках иммуноглобулинов, поскольку он образует дисульфидный мостик с в равной степени консервативным Cys 22-Hvy, который предшествует CDR H1. Тем не менее, в последовательности 7G6 данный дисульфидный мостик VH разрушается в результате мутации 94 Cys на 94 Ser. Исходное структурное моделирование с помощью BioLuminate продемонстрировало, что каркасные участки характеризуются небольшой деформацией, которая образуется в результате утраты дисульфидного

мостика. Тем не менее, разрушенная дисульфидная связь придает большую подвижность пептидному остову в Ser-94-hvy. В иллюстративных гуманизированных вариантах 7G6 CDR-H3 VH начинается в положении Ser-92 вместо Ser-94.

Даже при данном удлинении на два остатка CDR H3 антитела 7G6 содержит только 6 аминокислотных остатков: STSLDF. Сокращение CDR H3 открывает антигенсвязывающий карман, а также создает пространство для иллюстративного ротамера W89 ch1=0 домена VL легкой цепи, чтобы он упаковывался напротив тяжелой цепи.

Горячими точками для мутаций акцепторной последовательности человека 3U0T являются таковые, в которых каркасный остаток отличается от последовательности мыши, И такой каркасный остаток также характеризуется наилучшим потенциалом для образования вандерваальсовых контактов с ротамерами легкой цепи W89. Данные положения включают: 50W тяжелой цепи в начале CDR2 и иллюстративные обратные мутации в легкой цепи 36 (F на L), 37 (Q на L), 45 (R на K) и 100 (Q на G). В варианте реализации в тяжелой цепи используют остаток мыши 50W, поскольку он является частью CDR-H2.

Конструировали 2 варианта гуманизированной варибельной области тяжелой цепи и 8 вариантов гуманизированной варибельной области легкой цепи, содержащие различные пермутации замен, hu7G6-VH_v1 и hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO: 139-140, соответственно) и hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7 и hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO: 141-148, соответственно) (табл. 25 и 26). Иллюстративные дизайны гуманизированных VL и VH с обратными мутациями и другими мутациями на основе отобранных каркасных областей человека представлены в табл. 25 и 26, соответственно. Выделенные жирным шрифтом области в табл. 25 и 26 отмечают CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа. "-" в столбцах в табл. 25 и 26 указывает на отсутствие остатка в указанном положении. SEQ ID NO: 139-140 и SEQ ID NO: 141-148 содержат обратные мутации и другие мутации, как представлено в табл. 27. Аминокислоты в положениях в hu7G6-VH_v1 и hu7G6-VH_v2 перечислены в табл. 28. Аминокислоты в положениях в hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7 и hu7G6-VL_v8 перечислены в табл. 29. Процент степени гуманизации для гуманизированных цепей VH hu7G6-VH_v1 и hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO: 139-140, соответственно) по сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 149), а также для гуманизированных цепей VL hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7 и hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO: 141-148, соответственно) по сравнению с наиболее подобным геном зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 84) представлен в табл. 30.

Таблица 25

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VL 7G6 мыши (SEQ ID NO: 120)	Акцептор, учет. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO: 141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO: 142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO: 143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO: 144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO: 145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO: 146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO: 147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO: 148)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S

11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	L	L	L	L	L	L	L	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
18	18	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	T	S	T	T	T	T	T	T	T	T
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	27B	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
30	27C	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
31	27D	CDR-L1	D	Y	D	D	D	D	D	D	D	D
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
33	27F	CDR-L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	28	CDR-L1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
35	29	CDR-L1	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
36	30	CDR-L1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
37	31	CDR-L1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
38	32	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
39	33	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
40	34	CDR-L1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
41	35	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
42	36	Fr2	L	F	F	F	L	L	F	L	F	L
43	37	Fr2	L	Q	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
45	39	Fr2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
46	40	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
47	41	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
49	43	Fr2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
50	44	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
51	45	Fr2	K	R	R	R	R	R	K	K	R	R
52	46	Fr2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
53	47	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

54	48	Fr2	I	I	I	I	I	I	I	I	I
55	49	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
56	50	CDR-L2	L	Q	L	L	L	L	L	L	L
57	51	CDR-L2	V	I	V	V	V	V	V	V	V
58	52	CDR-L2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
59	53	CDR-L2	K	R	K	K	K	K	K	K	K
60	54	CDR-L2	L	L	L	L	L	L	L	L	L
61	55	CDR-L2	D	D	D	D	D	D	D	D	D
62	56	CDR-L2	S	P	S	S	S	S	S	S	S
63	57	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G
64	58	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V
65	59	Fr3	P	P	P	P	P	P	P	P	P
66	60	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D
67	61	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R
68	62	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F
69	63	Fr3	T	S	S	S	S	S	S	S	S
70	64	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G
71	65	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S
72	66	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G
73	67	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S
74	68	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G
75	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T
76	70	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F
78	72	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T
79	73	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L
80	74	Fr3	K	K	K	K	K	K	K	K	K
81	75	Fr3	I	I	I	I	I	I	I	I	I
82	76	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S
83	77	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R
84	78	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V
85	79	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	80	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A
87	81	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E
88	82	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D
89	83	Fr3	L	V	V	V	V	V	V	V	V
90	84	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G
91	85	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
94	88	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C
95	89	CDR-L3	W	L	W	W	W	W	W	W	W
96	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
97	91	CDR-L3	G	G	G	G	G	G	G	G	G
98	92	CDR-L3	T	T	T	T	T	T	T	T	T

99	93	CDR-L3	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
100	94	CDR-L3	F	Y	F	F	F	F	F	F	F	F
101	95	CDR-L3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
102	95A	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	95B	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	95C	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	95D	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	95E	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	95F	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	96	CDR-L3	Y	V	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
109	97	CDR-L3	T	L	T	T	T	T	T	T	T	T
110	98	Fr4	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
111	99	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
112	100	Fr4	G	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	G	G
113	101	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
114	102	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
115	103	Fr4	K	R	K	K	K	K	K	K	K	K
116	104	Fr4	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
117	105	Fr4	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
118	106	Fr4	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
119	106A	Fr4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
120	107	Fr4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Таблица 26

Линейный № остатка	№ остатка согласно Кэботу	FR или CDR	VH 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO: 137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO: 139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO: 140)
1	1	Fr1	E	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V

12	12	Fr1	V	K	V	V
13	13	Fr1	R	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A
17	17	Fr1	L	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	V	L	L
21	21	Fr1	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	Y	F	F
28	28	CDR-H1	N	Y	N	N
29	29	CDR-H1	I	T	I	I
30	30	CDR-H1	K	E	K	K
31	31	CDR-H1	D	A	D	D
32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	I	I	I	I
35	35	CDR-H1	H	H	H	H
36	35A	CDR-H1	-	-	-	-
37	35B	CDR-H1	-	-	-	-
38	36	Fr2	W	W	W	W
39	37	Fr2	V	V	V	V
40	38	Fr2	K	R	R	K
41	39	Fr2	Q	Q	Q	Q
42	40	Fr2	R	A	A	A
43	41	Fr2	P	P	P	P
44	42	Fr2	E	G	G	G
45	43	Fr2	Q	Q	Q	Q
46	44	Fr2	G	G	G	G
47	45	Fr2	L	L	L	L
48	46	Fr2	E	E	E	E
49	47	Fr2	W	W	W	W
50	48	Fr2	I	M	M	M
51	49	Fr2	G	G	G	G
52	50	CDR-H2	W	R	W	W
53	51	CDR-H2	I	I	I	I

54	52	CDR-H2	D	D	D	D
55	52A	CDR-H2	P	P	P	P
56	52B	CDR-H2				
57	52C	CDR-H2				
58	53	CDR-H2	E	A	E	E
59	54	CDR-H2	N	T	N	N
60	55	CDR-H2	G	G	G	G
61	56	CDR-H2	E	N	E	E
62	57	CDR-H2	T	T	T	T
63	58	CDR-H2	V	K	V	V
64	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y
65	60	CDR-H2	D	A	D	D
66	61	CDR-H2	P	P	P	P
67	62	CDR-H2	K	R	K	K
68	63	CDR-H2	F	L	F	F
69	64	CDR-H2	Q	Q	Q	Q
70	65	CDR-H2	G	D	G	G
71	66	Fr3	K	R	R	R
72	67	Fr3	A	V	V	V
73	68	Fr3	S	T	T	T
74	69	Fr3	I	M	I	I
75	70	Fr3	T	T	T	T
76	71	Fr3	S	R	R	R
77	72	Fr3	D	D	D	D
78	73	Fr3	T	T	T	T
79	74	Fr3	S	S	S	S
80	75	Fr3	S	T	T	T
81	76	Fr3	N	S	N	N
82	77	Fr3	T	T	T	T
83	78	Fr3	A	V	A	A
84	79	Fr3	Y	Y	Y	Y
85	80	Fr3	L	M	L	L
86	81	Fr3	Q	E	Q	Q
87	82	Fr3	L	L	L	L
88	82A	Fr3	R	S	S	S
89	82B	Fr3	S	S	S	S
90	82C	Fr3	L	L	L	L
91	83	Fr3	T	R	R	R
92	84	Fr3	S	S	S	S
93	85	Fr3	E	E	E	E
94	86	Fr3	D	D	D	D
95	87	Fr3	T	T	T	T
96	88	Fr3	A	A	A	A
97	89	Fr3	V	V	V	V

98	90	Fr3	Y	Y	Y	Y
99	91	Fr3	Y	Y	Y	Y
100	92	Fr3	S	C	S	S
101	93	Fr3	T	A	T	T
102	94	Fr3	S	S	S	S
103	95	CDR-H3	L	L	L	L
104	96	CDR-H3	-	Y	-	
105	97	CDR-H3	-	S	-	
106	98	CDR-H3	-	L	-	
107	99	CDR-H3	-	P	-	
108	100	CDR-H3	-	-	-	
109	100A	CDR-H3	-	-	-	-
110	100B	CDR-H3	-	-	-	-
111	100C	CDR-H3	-	-	-	-
112	100D	CDR-H3	-	-	-	-
113	100E	CDR-H3	-	-	-	-
114	100F	CDR-H3	-	-	-	-
115	100G	CDR-H3	-	-	-	-
116	100H	CDR-H3	-	-	-	-
117	100I	CDR-H3	-	-	-	-
118	100J	CDR-H3	-	-	-	-
119	100K	CDR-H3	-	-	-	-
120	101	CDR-H3	D	V	D	D
121	102	CDR-H3	F	Y	F	F
122	103	Fr4	W	W	W	W
123	104	Fr4	G	G	G	G
124	105	Fr4	Q	Q	Q	Q
125	106	Fr4	G	G	G	G
126	107	Fr4	T	T	T	T
127	108	Fr4	S	T	T	T
128	109	Fr4	V	V	V	V
129	110	Fr4	T	T	T	T
130	111	Fr4	V	V	V	V
131	112	Fr4	S	S	S	S
132	113	Fr4	S	S	S	S

Таблица 27
Обратные мутации и другие мутации V_H, V_L для гуманизированного 7G6

Вариант V _H или V _L	Экзон акцепторной последовательности V _H или V _L	Изменения по сравнению с остатками акцепторного каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа)
hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93
hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	H12, H20, H38, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93
hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L103
hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L37, L103
hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L36, L103
hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L36, L37, L103
hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L45, L103
hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L36, L37, L45, L103
hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO: 138)	L12, L100, L103
hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L36, L37, L100, L103

Таблица 28

Нумерация Кэбота остатков каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 7G6

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	VH 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
H12	K	V	V	V
H20	V	L	L	L
H38	R	K	R	K
H69	M	I	I	I
H76	S	N	N	N
H78	V	A	A	A
H80	M	L	L	L
H81	E	Q	Q	Q
H92	C	S	S	S
H93	A	T	T	T

Таблица 29

Нумерация Кэбота остатков каркасного участка (на основе CDR согласно сводному определению Кэбота/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 7G6

№ остатка согласно Кэботу	Акцептор, учетн. № PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	VL 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
L12	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L36	F	L	F	F	L	L	F	L	F	L
L37	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L
L45	R	K	R	R	R	R	K	K	R	R
L100	Q	G	Q	Q	Q	Q	Q	Q	G	G
L103	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Таблица 30
Процент степени гуманизации тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител 7G6

Вариант V _H или V _L	% степени гуманизации
hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	77,9%
hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)	76,8%
hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	89,0%
hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	88,0%
hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	88,0%
hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	87,0%
hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	88,0%
hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	86,0%
hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	89,0%
hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)	87,0%

Положения, в которых остатки канонического класса Чотиа, верньерные остатки или остатки поверхности взаимодействия/остатки упаковки отличаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами для замены. Примеры канонических остатков класса Чотиа включают остаток L2 согласно Кэботу в табл. 25 и 26. Примеры верньерных остатков включают остатки H66, H67, H69 и L49 согласно Кэботу в табл. 25 и 26. Примеры остатков поверхности взаимодействия/остатков упаковки (VH+VL) включают остатки H35, H37, H39, H45, H47, H93, H95, H97, H103, L34, L36, L39, L44, L45, L46, L87, L89, L91, L96 и L98 согласно Кэботу в табл. 25 и 26.

Основания для выбора положений, указанных в табл. 25 в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

P12S представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку Р редко встречается в каркасном участке в данном положении у людей.

F36L представляет собой обратную мутацию остатка поверхности взаимодействия.

Q37L: На основании структурной модели Leu потенциально может вступать в конфликт с W89 (VL) и VH CDR-H3 95Leu, вследствие этого исследуют обратную мутацию.

R45K представляет собой обратную мутацию остатка поверхности взаимодействия.

Q100G: Q потенциально может вступать в конфликт с W89 (VL), вследствие этого исследуют обратную мутацию Q100G.

R103K представляет собой мутацию на основе частоты, поскольку R редко встречается в каркасном участке в данном положении у людей.

Варибельные области легкой цепи:

VL MAT 7G6 мыши (SEQ ID NO: 120)

DVVMQTPTLTLSTIGQPASISCKSTQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHTFPYTFGGGKLEIKR

Акцепторная VL человека, PDB 3UOT_VL (SEQ ID NO: 138)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDAKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYQISRLDP
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHYPVLFGQGTRLEIKR

последовательность зародышевой линии человека IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 84)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHTWPLTFGGGKLEIKR

hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO: 141)

DVVMTQSPLSLVTLGQPASISCKSTQSLLDSGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTFPYTFGGGKLEIKR

hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO: 142)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWFLQRPQGSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO: 143)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWLQRPQGSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO: 144)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO: 145)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWFQRPQGSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO: 146)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

hu7G6-VL_v7: (SEQ ID NO: 147)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWFQRPQGSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGGGTKLEIKR

hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO: 148)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGGGTKLEIKR

Основания для выбора положений, указанных в табл. 26 в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, являются следующими.

K12V представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку V обнаруживается более часто, чем K, в данном положении.

V20L представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку L обнаруживается более часто, чем V, в данном положении.

R38K: структурная модель предсказывает, что Arg может вступать в конфликт с Tyr91 и потенциально может являться стабилизирующим остатком, но Lys также будет исследован в качестве обратной мутации.

M69I представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку I обнаруживается более часто, чем M, в данном положении в каркасном участке у людей и располагается поблизости от CDR-H2.

S76N представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку N обнаруживается более часто, чем S, в данном положении в каркасном участке у людей.

V78A представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку A обнаруживается более часто, чем V, в данном положении в каркасном участке у людей.

M80L представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку L обнаруживается более часто, чем M, в данном положении в каркасном участке у людей.

E81Q представляет собой обратную мутацию на основе частоты, поскольку Q обнаруживается более часто, чем E, в данном положении в каркасном участке у людей.

C92S: В последовательности мыши присутствует Ser. В норме Cys в данном положении образует дисульфидную связь, но у мышей данная связь разрушается, что потенциально предполагает подвижность. Для того, чтобы сохранить подвижность петли CDR, сохраняют Ser в данном положении путем проведения обратной мутации C92S.

A93T представляет собой обратную мутацию остатка поверхности взаимодействия.

Вариабельные области тяжелой цепи:

VH MAT 7G6 мыши (SEQ ID NO: 119)

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGET
VYDPKFQKGASITSDTSSNTAYLQLRSLTSEDVAVYYSTSLDFWGQGTSTVTVSS

Акцепторная VH человека DB 3UOT_VH (SEQ ID NO: 137)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYYTEAYYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPATGN
TKYAPRLQDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCASLYSLPVYWGQGTSTVTVS
S

последовательность зародышевой линии человека IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:
149)

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGE
TVYDPKFQKGASITSDTSSNTAYLQLRSLTSEDVAVYYSTSLDFWGQGTSTVTVSS

hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO: 139)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGE
TVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDVAVYYSTSLDFWGQGTSTVTVSS

hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO: 140)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQAPGQGLEWMGWIDPENGE
TVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDVAVYYSTSLDFWGQGTSTVTVSS

Пример 10. Картирование эпитопа 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 и 3D6.

Перекрывающиеся биотинилированные пептиды, охватывающие длину изоформы 4R0N тау (383 аминокислот), присоединяли к лункам планшета для ELISA, сенсibilизированного стрептавидином. Планшет промывали, блокировали и наносили антитела 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 и 3D6 мыши. После промывки на планшет наносили конъюгированное с пероксидазой хрена антитело против иммуноглобулинов мыши, после чего лунки обрабатывали OPD (о-фенилендиамин дигидрохлорид) для развития окрашивания. Считывание на планшетах проводили при поглощении 450 нм, фоновое поглощение в лунках, не содержащих первичное антитело, использовали в качестве пустой пробы для вычитания. Для антител 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 и 3D6 было обнаружено положительное связывание с пептидами, охватывающими аминокислоты 199-213 и 262-276 SEQ ID NO: 3. Данные пептиды соответствуют аминокислотам 257-271 и 315-329 в полноразмерном тау-белке человека 4R2N.

Перечень последовательностей

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQPTEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDE
AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKGQANATRIPAK
TPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSP
SSAKSRLQTAPVPMPLKKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD

NIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKI
 GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSST
 GSIDMVDSPLATLADEVASLAKQGL

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
 EPGSETSDAKSTPTAEAE EAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKG
 ADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPG
 TPGSRSRTPSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKSIGSTEN
 LKHQPGGGKVQIINKKL DLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGS
 LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
 AKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPLATLADEVASLAKQGL

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

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAE EAGIGDTPSLE
 DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIP
 AKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREP KKVAVVRTPPK
 SPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL DLSNVQSKCGS
 KDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQ
 SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNV
 SSTGSIDMVDSPLATLADEVASLAKQGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
 EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAPHTEIPEGTTAE EAGIGDTPSLEDE
 AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAK
 TPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSP
 SSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLG
 NIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK
 TDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPLATLADEVASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
 EPGSETSDAKSTPTAEAE EAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKG
 ADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPG

TPGSRSRTPSLTPPTREPCKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLDKNVSKIGSTEN
LKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKI
GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTPRHLNSVST
GSIDMVDSPLATLADEVASSLAKQGL

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLE
DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKGQANATRIP
AKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREPCKVAVVRTPPK
SPSSAKSRLQTAPVPMPLDKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSCGSL
GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
AKTDHGAEIVYKSPVVSGDTPRHLNSVSTGSIDMVDSPLATLADEVASSLAKQGL

SEQ ID NO:7; аминокислотная последовательность VH 5G8 мыши без сигнального пептида

EVQLQQSGAELVRSGASVRLSCTASGFNIKDYMHVWRQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
VYAPKFQGGKATMTSDTSSNTAYLHLSLTSEDVAVYYCSPLDFWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:8; аминокислотная последовательность VL 5G8 мыши без сигнального пептида

DVVMQTPLTSLVITGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKIRRVAEADLGVYYCWQGTLPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:9: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность VH 5G8 мыши, с сигнальным пептидом

ATGAAATGCAGCTGGGTCATCTTCTCCTGATGGCAGTGGTTATAGGAATCAATTCA
GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAGGTCAGGGGCCTCAGTCAG
GTTGTCTGACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGGACTACTATATGCACTGGGTGAG
GCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTG
ATACTGTATATGCCCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCACTATGACTTCAGACACATCCT
CCAACACAGCCTACCTGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAAGACACTGCCGTCTATT
ACTGTAGCCCCCTTGACTTCTGGGGCCAAGGCCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:10: нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность VL 5G8 мыши, с сигнальным пептидом:

ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTACTCTGGATTCTGGGAAACCAAC
GGTGATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTTGGACAACCA
GCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATAT
TTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTG
TCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGA
TTTCACACTGAAAATCCGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTG
GCAAGGTACACTTTTTCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAC
GG

SEQ ID NO:11: HCDR-1 5G8 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа
GFNIKDYMH

SEQ ID NO:12: HCDR-2 5G8 мыши согласно Кэботу
WIDPENGDTVYAPKFQG

SEQ ID NO:13: HCDR-3 5G8 мыши согласно Кэботу
LDF

SEQ ID NO:14: LCDR-1 5G8 мыши согласно Кэботу
KSSQSL LDSDGKTYLN

SEQ ID NO:15: LCDR-2 5G8 мыши согласно Кэботу
LVSKLDS

SEQ ID NO:16: LCDR-3 5G8 мыши согласно Кэботу
WQGTLPYPT

SEQ ID NO:17 HCDR-1 5G8 мыши согласно Кэботу
DYMH

SEQ ID NO:18 HCDR-1 5G8 мыши согласно Чотиа
GFNIKDY

SEQ ID NO:19 HCDR-1 5G8 мыши согласно контактному определению
KDYYMH

SEQ ID NO:20 HCDR-2 5G8 мыши согласно Чотиа
DPENG

SEQ ID NO:21 HCDR-2 5G8 мыши согласно AbM
WIDPENGDTV

SEQ ID NO:22 HCDR-2 5G8 мыши согласно контактному определению
WIGWIDPENGDTV

SEQ ID NO:23 HCDR-3 5G8 мыши согласно контактному определению
SPLD

SEQ ID NO:24 LCDR-1 5G8 мыши согласно контактному определению
KTYLNWL

SEQ ID NO:25 LCDR-2 5G8 мыши согласно контактному определению
RLIYLVSKLD

SEQ ID NO:26 LCDR-3 5G8 мыши согласно контактному определению
WQGTLPY

SEQ ID NO:27 >3F4-VH
KVKLQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIQQWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGNSE
YAPRFQGKATMTADTLSTAYLQLSSLTSEDVAVYYCNADLHDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:28 >aDabi-Fab2b-VH
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGETNPRNG
GTTYNEKFKGKATMTRDTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTIGTSGYDYFDYWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO:29 >IGHV1-46

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGS
TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCAR

SEQ ID NO:30 >3F4-VL

DVVMQTPTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLIWVFQRPQGSPKRLIFLVSKRDS
GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHPHTVGGGKLEIA

SEQ ID NO: 31 >aDabi-Fab2b-VL

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSDGNIYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSRYFS
GVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHVPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO: 32 >IGKV2-29

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVSSRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLP

SEQ ID NO:33 > hu5G8-VH_v1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENG
DTVYAPKFQGKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCTILDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:34 > hu5G8-VH_v2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWIGWIDPENGD
TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:35 hu5G8-VH_v3

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWIGWIDPENGD
TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:36 > hu5G8-VH_v4

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
TVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:37 > hu5G8-VH_v5

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWIDPENGD
TVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:38 > hu5G8-VH_v6

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCAASGFNIKDYMHVVRQAPGQGLDWIGWIDPENG
TVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:39 > hu5G8-VH_v7

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHVVRQAPGQGLEWMGWIDPENG
DTVYAPKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARLDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:40 > hu5G8-VH_v8

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHVVRQAPGQGLDWIGWIDPENG
TVYAPKFQGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:41 > hu5G8-VL_v1

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWYLQKPGQSPKLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:42 > hu5G8-VL_v2

DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:43 > hu5G8-VL_v3

DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:44 > hu5G8-VL_v4

DVVMTQSPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:45 > hu5G8-VL_v5

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:46 > hu5G8-VL_v6

DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:47 > аминокислотная последовательность VH 5G8 мышцы с сигнальным пептидом

MKCSWVIFFLMAVVIGINSEVQLQQSGAELVRSGASVRLSCTASGFNIKDYIMHWVRQ
RPEQGLEWIGWIDPENGDVYAPKFQGKATMTSDTSSNTAYLHLSLTSEDVAVYYCSP
LDFWGQGTTLVSS

SEQ ID NO:48 > аминокислотная последовательность VL 5G8 мышцы с сигнальным пептидом

MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLSDGKTYLN
WLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKIRRVEAEDLGVYYCWQGT
LPYTFFGGGTTKLEIK

SEQ ID NO: 49 >: аминокислотная последовательность m6A10VH:

MKCSWVIFFLMAVVIGINSEVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYIHWVKQR
PEQGLEWIGWIDPENDDTEYAPKFQGRATLTDTSSNTAYLQLSLTSEDVAVYYCTPL
DYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 50 : аминокислотная последовательность m6A10VL:

MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLSDGKTYLN
WLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGT
HPYTFFGGGTTKLEIKR

SEQ ID NO: 51 : аминокислотная последовательность m7G6VH:

MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQ
RPEQGLEWIGWIDPENGETVYDPKFQKASITSDTSSNTAYLQLRSLTSEDVAVYYSTSL
DFWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 52 аминокислотная последовательность m7G6VL:

MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSTQSLLSDGKTYLN
WLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGT
HPYTFFGGGTTKLEIKR

SEQ ID NO: 53 аминокислотная последовательность m8A4VH:

MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQ
RPEQGLEWIGWIDPENGDTVYDPQFQDKANITADTSSNTAYLQLSSLTSEGTAVYYCST
LDFWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO: 54 аминокислотная последовательность m8A4VL:
MMSPAQFLFLLVLWNRETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLSDGKTYLN
WLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCWQGTH
FPCTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO:55; аминокислотная последовательность VH 3D6 мыши:
EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
VYDPKFQGGKATITADTSSNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO:56; HCDR1 3D6 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа:
GFNIKDYIYLH

SEQ ID NO:57; HCDR2 3D6 мыши согласно Кэботу:
WIDPENGDTVYDPKFQG

SEQ ID NO:58; HCDR3 3D6 мыши согласно Кэботу:
LDF

SEQ ID NO:59; аминокислотная последовательность VL 3D6 мыши:
DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO:60; LCDR1 3D6 мыши согласно Кэботу:
KSSQSLLSDGKTYLN

SEQ ID NO: 61 ; LCDR2 3D6 мыши согласно Кэботу:
LVSKLDS

SEQ ID NO:62 ; LCDR3 3D6 мыши согласно Кэботу:
WQGTHFPYT

SEQ ID NO: 63 аминокислотная последовательность зрелой области m6A10VH:
EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENDDTE
YAPKFQGRATLTDTSSNTAYLQLSSLTSEDYVYYCTPLDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 64 : аминокислотная последовательность зрелой области m6A10VL:
DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCWQGTTFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 65 CDR-H1 6A10 мыши согласно сводному определению
Кэбота/Чотиа:
GLNIKDYYIH

SEQ ID NO:66 CDR-H2 6A10 мыши согласно Кэботу:
WIDPENDDTEYAPKFQG

SEQ ID NO: 67 CDR-H3 6A10 мыши согласно Кэботу:
LDY

SEQ ID NO: 68 CDR-L1 6A10 мыши согласно Кэботу:
KSSQSLLDSGKTYLN

SEQ ID NO: 69 CDR-L2 6A10 мыши согласно Кэботу:
LVSKLDS

SEQ ID NO: 70 CDR-L3 6A10 мыши согласно Кэботу:
WQGTTFPYT

SEQ ID NO: 71 CDR-H1 6A10 мыши согласно Кэботу:
DYYIH

SEQ ID NO: 72 CDR-H1 6A10 мыши согласно Чотиа:
GLNIKDY

SEQ ID NO: 73 CDR-H1 6A10 мыши согласно контактному определению:
KDYYIH

SEQ ID NO:74 CDR-H2 6A10 мыши согласно Чотиа:
DPENDD

SEQ ID NO:75 CDR-H2 6A10 мыши согласно AbM:
WIDPENDDTE

SEQ ID NO:76 CDR-H2 6A10 мыши согласно контактному определению:
WIGWIDPENDDTE

SEQ ID NO:77 CDR-H3 6A10 мыши согласно контактному определению:
TPLD

SEQ ID NO: 78 CDR-L1 6A10 мыши согласно контактному определению:
KTYLNWL

SEQ ID NO: 79 CDR-L2 6A10 мыши согласно контактному определению:
RLIYLVSKLD

SEQ ID NO: 80 CDR-L3 6A10 мыши согласно контактному определению:
WQGTHFPY

SEQ ID NO: 81 Акцепторная VH 6A10, учетный № ACR16112:
QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSG
DTNYAQKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARLAARPLDYWGQGLVT
VSS

SEQ ID NO: 82 последовательность зародышевой линии человека IGHV1-2*02:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSG
GTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARSRRGYDFWSGSPEDY
WGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 83 Акцепторная VL 6A10, учетный №ABC66863:
DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD
SGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHRPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 84 последовательность зародышевой линии человека IGKV2-30*02:
 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 85 hu6A10-VH_v1:
 QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCASGLNIKDYYIHWVRQAPGGGLEWMGWIDPENDD
 TEYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 86 hu6A10-VH_v2:
 QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCASGLNIKDYYIHWVRQAPGGGLEWIGWIDPENDDT
 EYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 87 hu6A10-VH_v3:
 QVQLQESGAEVKKPGGSVKVSCASGLNIKDYYIHWVRQAPGGGLEWIGWIDPENDDT
 EYAPKFQGRVTITRDTISISTAYLELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 88 hu6A10-VL_v1:
 DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 89 hu6A10-VL_v2:
 DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 90 hu6A10-VL_v3:
 DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 91 зрелая область VH 8A4 мыши:
 EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
 VYDPQFQDKANITADTSSNTAYLQLSSLTSEGTAVYYCSTLDFWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 92 зрелая область VL 8A4 мыши:

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCWQGTHFPCTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 93 CDR-H1 8A4 мыши согласно сводному определению Кэбота/Чотиа:
GFNIKDYIYH

SEQ ID NO:94 CDR-H2 8A4 мыши согласно Кэботу:
WIDPENGDTVYDPQFQD

SEQ ID NO: 95 CDR-H3 8A4 мыши согласно Кэботу:
LDF

SEQ ID NO: 96 CDR-L1 8A4 мыши согласно Кэботу:
KSSQSLDSDGKTYLN

SEQ ID NO: 97 CDR-L2 8A4 мыши согласно Кэботу:
LVSKLDS

SEQ ID NO: 98 CDR-L3 8A4 мыши согласно Кэботу:
WQGTHFPCT

SEQ ID NO: 99 CDR-H1 8A4 мыши согласно Кэботу:
DYIYH

SEQ ID NO: 100 CDR-H1 8A4 мыши согласно Чотиа:
GFNIKDY

SEQ ID NO: 101 CDR-H1 8A4 мыши согласно контактному определению:
KDYYIYH

SEQ ID NO:102 CDR-H2 8A4 мыши согласно Чотиа:
DPENG

SEQ ID NO:103 CDR-H2 8A4 мыши согласно AbM:
WIDPENGDTV

SEQ ID NO:104 CDR-H2 8A4 мыши согласно контактному определению:
WIGWIDPENGDTV

SEQ ID NO:105 CDR-H3 8A4 мыши согласно контактному определению:
STLD

SEQ ID NO: 106 CDR-L1 8A4 мыши согласно контактному определению:
KTYLNWL

SEQ ID NO: 107 CDR-L2 8A4 мыши согласно контактному определению:
RLIYLVSKLD

SEQ ID NO: 108 CDR-L3 8A4 мыши согласно контактному определению:
WQGTHFPC

SEQ ID NO: 109 3JAU VH:
EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGKIDPANGNTK
YDPKFQDKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCANSNYWFDYWGQGTTLTVS
S

SEQ ID NO: 110 ADU57742:
QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSNPVSWVRQAPGQGLEWMGGIIPFAQKV
LGAQRVRDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCATGQQLYSLHYWGQGTTLTV
SS

SEQ ID NO: 111 3JAU VL:
DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVG VYYCYQGSHVPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 112 ABA26100:
DVMTSSSVTGASSCRSSSVYSDGSTWNWRGSRRYDVSTRDSGVDRSGSGSGTDTKSRV
ADVG VYYCMDWHTGGTKK

SEQ ID NO: 113 hu8A4-VH_v1:

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENG
TVYDPQFQDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 114 hu8A4-VH_v2:

QVQLQQSGAEVVKPGGSVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENG
TVYDPQFQDRITITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 115 hu8A4-VH_v3:

QVQLQQSGAEVVKPGGSVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDPENGD
TVYDPQFQDRATITADTSTSTAYMELSGLRSEDVAVYYCATLDFWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 116 hu8A4-VL_v1:

DIVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 117 hu8A4-VL_v2:

DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 118 hu8A4-VL_v3:

DVVMQTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 119 VH MAT 7G6 мыши:

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGET
VYDPKFQGKASITSDTSSNTAYLQLRSLTSEDVAVYYSTSLDFWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 120 VL MAT 7G6 мыши:

DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCKSTQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO: 121 CDR-H1 7G6 мыши согласно сводному определению

Кэбота/Чотиа:

GFNIKDYIHW

SEQ ID NO:122 CDR-H2 7G6 мыши согласно Кэботу:
WIDPENGETVYDPKFQG

SEQ ID NO: 123 CDR-H3 7G6 мыши согласно Кэботу:
LDF

SEQ ID NO: 124 CDR-L1 7G6 мыши согласно Кэботу:
KSTQSLDSDGKTYLN

SEQ ID NO: 125 CDR-L2 7G6 мыши согласно Кэботу:
LVSKLDS

SEQ ID NO: 126 CDR-L3 7G6 мыши согласно Кэботу:
WQGTHTFPYT

SEQ ID NO: 127 CDR-H1 7G6 мыши согласно Кэботу:
DYYIH

SEQ ID NO: 128 CDR-H1 7G6 мыши согласно Чотиа:
GFNIKDY

SEQ ID NO: 129 CDR-H1 7G6 мыши согласно контактному определению:
KDYYIH

SEQ ID NO:130 CDR-H2 7G6 мыши согласно Чотиа:
DPENGE

SEQ ID NO:131 CDR-H2 7G6 мыши согласно AbM:
WIDPENGETV

SEQ ID NO:132 CDR-H2 7G6 мыши согласно контактному определению:
WIGWIDPENGETV

SEQ ID NO:133 CDR-H3 7G6 мыши согласно контактному определению:
TSLD

SEQ ID NO: 134 CDR-L1 7G6 мыши согласно контактному определению:
KTYLNWL

SEQ ID NO: 135 CDR-L2 7G6 мыши согласно контактному определению:
RLIYLVSKLD

SEQ ID NO: 136 CDR-L3 7G6 мыши согласно контактному определению:
WQGTHFPY

SEQ ID NO: 137 Акцепторная VH человека DB 3U0T_VH:
QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYYTEAYYIHWRQAPQGQLEWMGRIDPATGN
TKYAPRLQDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDТАVYYCASLYSLPVYWGQGTТVTVS
S

SEQ ID NO: 138 Акцепторная VL человека PDB 3U0T_VL:
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDAKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYQISRLDP
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHYPVLFGQGTTRLEIKR

SEQ ID NO: 139 hu7G6-VH_v1:
QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPQGQLEWMGWIDPENGE
TVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDТАVYYSTSLDFWGQGTТVTVSS

SEQ ID NO: 140 hu7G6-VH_v2:
QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQAPQGQLEWMGWIDPENGE
TVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDТАVYYSTSLDFWGQGTТVTVSS

SEQ ID NO: 141 hu7G6-VL_v1:
DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIKR

SEQ ID NO: 142 hu7G6-VL_v2:
DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSGKTYLNWFLQRPQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIKR

SEQ ID NO: 143 hu7G6-VL_v3:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

SEQ ID NO: 144 hu7G6-VL_v4:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

SEQ ID NO: 145 hu7G6-VL_v5:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

SEQ ID NO: 146 hu7G6-VL_v6:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQQRPGQSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGQGTKLEIKR

SEQ ID NO: 147 hu7G6-VL_v7:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO: 148 hu7G6-VL_v8:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQQRPGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTGTHFPYTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO: 149 последовательность зародышевой линии человека IGHV1-69-2*01
EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGET
VYDPKFQKGASITSDTSSNTAYLQLRSLTSEDTA VYYSTSLDFWGQGTSTVTVSS

Перечень последовательностей

- <110> Протена Биосайенсис лимитед
Барбур, Робин
Александр, Светлана
Ренц, Марк Е.
Гай, Шанинг
Ниджджар, Тарлохан С.
Долан, Филипп
Пэйн, Филипп
- <120> Антитела, распознающие тау
- <130> 057450-508111
- <150> US 62/500,427
<151> 2017-05-02
- <150> US 62/580,408
<151> 2017-11-01
- <160> 149
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

<210> 2
<211> 412
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
 65 70 75 80
 Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
 85 90 95
 Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
 100 105 110
 Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
 115 120 125
 Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
 130 135 140
 Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
 165 170 175
 Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
 180 185 190
 Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
 210 215 220
 Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 245 250 255
 Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro

260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
 275 280 285
 Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 305 310 315 320
 Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
 325 330 335
 Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
 340 345 350
 Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
 355 360 365
 Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
 370 375 380
 Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala
 385 390 395 400
 Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 405 410
 <210> 3
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
 35 40 45
 Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
 50 55 60
 Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp

045249

65					70					75					80
Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro
				85					90					95	
Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	Gly	Gln	Lys	Gly	Gln	Ala	Asn	Ala	Thr	Arg
			100					105					110		
Ile	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly
		115					120					125			
Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser
	130					135					140				
Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro
145					150					155					160
Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys	Val	Ala	Val	Val	Arg	Thr	Pro	Pro	Lys
				165					170					175	
Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys	Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met
			180					185					190		
Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Glu	Asn	Leu
		195					200					205			
Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Gln	Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Leu
	210					215					220				
Asp	Leu	Ser	Asn	Val	Gln	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Ile	Lys
225					230					235					240
His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Pro	Val	Asp
				245					250					255	
Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	His	His
			260					265					270		
Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Glu	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Phe
		275					280					285			
Lys	Asp	Arg	Val	Gln	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	His
	290					295					300				
Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Lys	Lys	Ile	Glu	Thr	His	Lys	Leu	Thr	Phe
305					310					315					320

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
 325 330 335

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
 340 345 350

Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala
 355 360 365

Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375 380

<210> 4
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
 275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly
 290 295 300

Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln
 305 310 315 320

Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly
 325 330 335

Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
 340 345 350

Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
 355 360 365

Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
 370 375 380

Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
 385 390 395 400

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 405 410

<210> 5
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
 65 70 75 80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
 85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
 100 105 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
 115 120 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
 130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
 145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
 165 170 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
 180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
 195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
 210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
245 250 255

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
260 265 270

Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
275 280 285

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
290 295 300

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
305 310 315 320

Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
325 330 335

Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser
340 345 350

Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu
355 360 365

Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 6
<211> 352
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
35 40 45

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
 65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
 85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
 100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
 115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
 130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
 165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
 180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
 195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
 210 215 220

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
 225 230 235 240

His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
 245 250 255

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
 260 265 270

His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
 275 280 285

Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
 290 295 300

Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
 305 310 315 320

Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
 325 330 335

Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 340 345 350

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 7

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 8
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 8

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

	20		25		30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser					
	35		40		45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro					
	50		55		60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile					
65		70		75	80
Arg Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly					
	85		90		95
Thr Leu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100		105		110

Arg

<210> 9
 <211> 393
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 9
 atgaaatgca gctgggtcat cttcttcctg atggcagtgg ttataggaat caattcagag 60
 gttcagctgc agcagtctgg ggcagagctt gtgaggtcag gggcctcagt caggttgtcc 120
 tgcacagctt ctggcttcaa cattaaggac tactatatgc actgggtgag gcagagggcct 180
 gaacagggcc tggagtggat tggatggatt gatcctgaga atggtgatac tgtatatgcc 240
 ccgaagttcc agggcaaggc cactatgact tcagacacat cctccaacac agcctacctg 300
 cacctcagca gcctgacatc tgaagacact gccgtctatt actgtagccc ccttgacttc 360
 tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca 393

<210> 10
 <211> 399
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 10
 atgatgagtc ctgcccagtt cctgtttctg ttagtactct ggattcggga aaccaacggt 60
 gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctcc 120

```

atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg      180
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaatact atctggtgtc taaactggac      240
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc      300
cgcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtag actttttccg      360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg                                399

```

```

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная

```

```

<220>
<223> Синтезированная

```

```

<400> 11

```

```

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His
1           5           10

```

```

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная

```

```

<220>
<223> Синтезированная

```

```

<400> 12

```

```

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1           5           10           15

```

```

Gly

```

```

<210> 13

```

```

<400> 13
000

```

```

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная

```

```

<220>
<223> Синтезированная

```

```

<400> 14

```

```

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1           5           10           15

```

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 15

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 16

Trp Gln Gly Thr Leu Phe Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 17

Asp Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 18

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 1 5

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 19

Lys Asp Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 20

Asp Pro Glu Asn Gly Asp
1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 21

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val
1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 22

Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val
1 5 10

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 23

Ser Pro Leu Asp
1

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 24

Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu
 1 5

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 25

Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 1 5 10

<210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 26

Trp Gln Gly Thr Leu Phe Pro Tyr
 1 5

<210> 27
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 27

Lys Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Ser Glu Tyr Ala Pro Arg Phe

045249

50					55					60					
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Met	Thr	Ala	Asp	Thr	Leu	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Asn	Ala	Asp	Leu	His	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val
			100					105					110		

Ser Ser

```
<210> 28
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Thr Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```
<210> 29
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ile Trp Val Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Phe Leu Val Ser Lys Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Val Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ala
100 105 110

<210> 31
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 32
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Ile His Leu Pro
100

<210> 33
<211> 112
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтезированная

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 34
<211> 112
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтезированная

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 35
<211> 112
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтезированная

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 36
<211> 112
<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 37

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

045249

20							25					30			
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			100					105					110		

<210>	40
<211>	112
<212>	PRT
<213>	Искусственная

<220>
<223> Синтезированная

$\langle 400 \rangle$ 40

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

$\langle 210 \rangle$	41
$\langle 211 \rangle$	112

<212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 41

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr Leu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 42
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 42

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Lys Ile

65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly
				85					90					95	
Thr	Leu	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		
<210>	43														
<211>	112														
<212>	PRT														
<213>	Искусственная														
<220>															
<223>	Синтезированная														
<400>	43														
Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser
			20					25					30		
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly
				85					90					95	
Thr	Leu	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		
<210>	44														
<211>	112														
<212>	PRT														
<213>	Искусственная														
<220>															
<223>	Синтезированная														
<400>	44														
Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr Leu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 45

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr Leu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 46

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 46

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr Leu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 47
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 47

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Ile Gly
 1 5 10 15

Ile Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Ser Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala
65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
115 120 125

Val Ser Ser
130

<210> 48
<211> 132
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтезированная

<400> 48

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
1 5 10 15

Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
20 25 30

Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Arg Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Trp Gln Gly Thr Leu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys

130

<210> 49
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 49

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Ile Gly
 1 5 10 15

Ile Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Ser Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile
 35 40 45

Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu Tyr Ala
 65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 115 120 125

Val Ser Ser
 130

<210> 50
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 50

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
20 25 30

Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg
130

<210> 51
<211> 131
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтезированная

<400> 51

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val Tyr Asp
65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn

045249

85

90

95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Ser Thr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
115 120 125

Val Ser Ser
130

<210> 52
<211> 133
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтезированная

<400> 52

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
1 5 10 15

Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
20 25 30

Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg
130

<210> 53
<211> 131

<212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 53

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45

Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp
 65 70 75 80

Pro Gln Phe Gln Asp Lys Ala Asn Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Gly Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 115 120 125

Val Ser Ser
 130

<210> 54
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 54

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Asn Arg
 1 5 10 15

Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
 20 25 30

Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45
 Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Arg
 130

 <210> 55
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Синтезированная

 <400> 55

 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Asp Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 56

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His
 1 5 10

<210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 57

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 58

<400> 58
 000

<210> 59
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 59

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

045249

50		55		60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile				
65		70		75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly				
	85		90	95
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys				
	100		105	110

Arg

<210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 60

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 61

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 62

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 63
 <211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 63

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 64

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 64

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

045249

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210>	65
<211>	10
<212>	PRT
<213>	Искусственная

<220>
<223> Синтезированная

<400> 65

Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210>	66
<211>	17
<212>	PRT
<213>	Искусственная

<220>
<223> Синтезированная

<400> 66

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 67

<400> 67
000

<210>	68
<211>	16
<212>	PRT
<213>	Искусственная

<220>
<223> Синтезированная

<400> 68

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 69

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 69

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

<210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 70

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 71
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 71

Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5

<210> 72
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 72

Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr
 1 5

<210> 73
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 73

Lys Asp Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 74

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 74

Asp Pro Glu Asn Asp Asp
1 5

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 75

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 76

Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 77

<211> 4

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 77

Thr Pro Leu Asp
1

<210> 78

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 78

Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu
 1 5

<210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 79

Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 1 5 10

<210> 80
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 80

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr
 1 5

<210> 81
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 81

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Thr Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ala Ala Arg Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Arg Arg Gly Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Pro Glu
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 83
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

045249

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 84

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 85
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 85

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Thr Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 86
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 86

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Thr Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 87

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 87

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 88

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 88

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 89

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 89

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 90
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 90

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 91
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 91

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Gln Phe
 50 55 60

Gln Asp Lys Ala Asn Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 92

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 92

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 93

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 94
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 94

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Gln Phe Gln
 1 5 10 15

Asp

<210> 95

<400> 95
 000

<210> 96
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 96

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 97
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 97

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

<210> 98
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 98

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Cys Thr
1 5

<210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 99

Asp Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 100

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
1 5

<210> 101

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 101

Lys Asp Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 102

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 102

Asp Pro Glu Asn Gly Asp
1 5

<210> 103

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 103

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val
 1 5 10

<210> 104
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 104

Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val
 1 5 10

<210> 105
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 105

Ser Thr Leu Asp
 1

<210> 106
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 106

Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu
 1 5

<210> 107
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 107

Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 1 5 10

<210> 108

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 108

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Cys
 1 5

<210> 109

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 109

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Lys Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Asn Ser Asn Tyr Trp Phe Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 110

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Asn
20 25 30

Pro Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Phe Ala Gln Lys Val Leu Gly Ala Gln Arg Val
50 55 60

Arg Asp Arg Ile Asn Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gln Gln Leu Tyr Ser Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 111

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 111

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Gly

045249

85

90

95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 112

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Asp Val Met Thr Ser Ser Ser Val Thr Gly Ala Ser Ser Cys Arg Ser
1 5 10 15

Ser Ser Val Tyr Ser Asp Gly Ser Thr Trp Asn Trp Arg Gly Ser Arg
20 25 30

Arg Tyr Asp Val Ser Thr Arg Asp Ser Gly Val Asp Arg Ser Gly Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Thr Asp Thr Lys Ser Arg Val Ala Asp Val Gly Val Tyr
50 55 60

Tyr Cys Met Asp Trp His Thr Gly Gly Thr Lys Lys
65 70 75

<210> 113

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 113

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Gln Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Ile Asn Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 114

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 114

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Gln Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Ile Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 115

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 115

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Gln Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 116

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 116

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 117

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 117

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 118

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 118

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 119

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 119

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Ser
85 90 95

Thr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 120

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 120

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 121
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 121

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 122
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 122

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 123

<400> 123
 000

<210> 124
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 124

Lys	Ser	Thr	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn
1				5					10					15	

<210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 125

Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser
1				5		

<210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 126

Trp	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr
1				5				

<210> 127
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 127

Asp	Tyr	Tyr	Ile	His
1				5

<210> 128
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 128

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

1

5

<210> 129

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 129

Lys Asp Tyr Tyr Ile His

1

5

<210> 130

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 130

Asp Pro Glu Asn Gly Glu

1

5

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 131

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val

1

5

10

<210> 132

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтезированная

<400> 132

Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val

1

5

10

<210> 133
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 133

Thr Ser Leu Asp
 1

<210> 134
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 134

Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu
 1 5

<210> 135
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 135

Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 1 5 10

<210> 136
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 136

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr
 1 5

<210> 137
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 137

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Tyr Thr Glu Ala Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Arg Leu
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Pro Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 138

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gln Ile Ser Arg Leu Asp Pro Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

Thr His Tyr Pro Val Leu Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 139
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 139

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Ser
 85 90 95

Thr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 140
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 140

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Ser
 85 90 95
 Thr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 <210> 141
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтезированная
 <400> 141
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

<210> 142
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 142

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 143
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 143

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 144
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 144

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 145
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 145

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 146
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 146

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 147
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 147

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 148
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 148

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 149
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 149

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Ser
85 90 95

Thr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с тау человека, или его связывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 17, 12 и 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 14, 15 и 16.

2. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по п.1, где указанное выделенное моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

3. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.2, где указанное гуманизированное антитело содержит гуманизированную вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 17, 12 и 13, и гуманизированную вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 14, 15 и 16.

4. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.3, где по меньшей мере одно из следующих положений в гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи занимает аминокислота, как указано: Н1 занимает Q или E, Н11 занимает V или L, Н12 занимает K или V, Н19 занимает K или R, Н20 занимает V или L, Н23 занимает K или A, Н46 занимает E или D, Н48 занимает M или I, Н66 занимает K или R, Н67 занимает A или V, Н71 занимает R или S, Н76 занимает S или N, Н78 занимает A или V, Н80 занимает M или L, Н93 занимает T, S или A, и Н94 занимает I, P или R.

5. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.4, при условии, что положения Н1, Н11, Н12, Н19, Н20, Н23, Н46, Н48, Н71, Н76, Н80, Н93 и Н94 в гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи занимает E, L, V, R, L, A, D, I, S, N, L, S и P, соответственно.

6. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.3-5, где по меньшей мере одно из следующих положений в гуманизированной вариабельной области легкой цепи занимает аминокислота, как указано: L2 занимает V, L7 занимает S, L17 занимает E, L36 занимает L, L45 занимает Q, L46 занимает R, и L70 занимает D.

7. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.6, при условии, что положения L2, L7, L17, L36, L46, L70 в гуманизированной вариабельной области легкой цепи занимает V, S, E, L, R и D, соответственно.

8. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.3, где указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 33-40, и указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 41-46.

9. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с тау человека, или его связывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 71, 66 и 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 68, 69 и 70.

10. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по п.9, где указанное выделенное моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

11. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.10, где указанное гуманизированное антитело содержит гуманизированную вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 71, 66 и 67, и гуманизированную вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 68, 69 и 70.

12. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.10 или 11, содержащее гуманизированную вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 85-87, и гуманизированную вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 88-90.

13. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.12, где по меньшей мере одно из следующих положений в гуманизированной вариательной области тяжелой цепи занимает аминокислота, как указано: H16 занимает A или G, H48 занимает M или I, H69 занимает T или I, и H80 занимает M или L.

14. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.13, где положения H16, H48, H69 и H80 в гуманизированной вариательной области тяжелой цепи занимает G, I, I и L, соответственно.

15. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.12-14, где по меньшей мере одно из следующих положений в гуманизированной вариательной области легкой цепи занимает аминокислота, как указано: L12 занимает P или S, L17 занимает Q или E, и L46 занимает R или L.

16. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.15, где положения L12, L17 и L46 в гуманизированной вариательной области легкой цепи занимает S, E и L, соответственно.

17. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.9, где указанная вариательная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85-87, и указанная вариательная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 88-90.

18. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с тау человека, или его связывающий фрагмент, содержащее вариательную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 99, 94 и 95, и вариательную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 96, 97 и 98.

19. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по п.18, где указанное выделенное моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

20. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по п.19, где указанное гуманизированное антитело содержит гуманизованную вариательную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 99, 94 и 95, и гуманизованную вариательную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 96, 97 и 98.

21. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по п.20, где указанная гуманизованная вариательная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 113-115, и указанная гуманизованная вариательная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 116-118.

22. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по п.21, где по меньшей мере одно из следующих положений в гуманизированной вариательной области тяжелой цепи занимает аминокислота, как указано: H12 занимает K или V, H16 занимает S или G, H20 занимает V или L, H48 занимает M или I, H67 занимает A или I, H68 занимает N или T, H85 занимает D или E, и H93 занимает S или A.

23. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по п.22, где положения H12, H16, H20, H48, H67, H68 и H85 в гуманизированной вариательной области тяжелой цепи занимает V, G, L, I, A, T и E, соответственно.

24. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.21-23, где по меньшей мере одно из следующих положений в гуманизированной вариательной области легкой цепи занимает аминокислота, как указано: L2 занимает I или V, L17 занимает Q или E, и L36 занимает F или L.

25. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по п.24, где положения L2, L17 и L36 в гуманизированной вариательной области легкой цепи занимает V, E и L.

26. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по п.19, где указанная вариательная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 113-115, и указанная вариательная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 116-118.

27. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с тау человека, или его связывающий фрагмент, содержащее вариательную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 127, 122 и 123, и вариательную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 124, 125 и 126.

28. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент п.27, где указанное выделенное моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

29. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.28, где указанное гуманизированное антитело содержит гуманизованную вариательную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 127, 122 и 123, и гуманизованную вариательную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 124-126.

30. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.28, где указанное гуманизированное антитело содержит гуманизованную вариательную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 139 или

140, и гуманизированную переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 141-148.

31. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.30, где по меньшей мере одно из следующих положений в гуманизированной переменной области тяжелой цепи занимает аминокислота, как указано: H12 занимает К или V, H20 занимает V или L, H38 занимает R или К, H69 занимает М или I, H76 занимает S или N, H78 занимает V или А, H80 занимает М или L, H81 занимает Е или Q, H92 занимает С или S, и H93 занимает А или Т.

32. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.31, где положения H12, H20, H38, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 в гуманизированной переменной области тяжелой цепи занимает V, L, К, I, N, А, L, Q, S и Т, соответственно.

33. Выделенное антитело или его связывающий фрагмент по п.28, где указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 139 или 140, и указанная переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 141-148.

34. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-33, где указанное моноклональное антитело относится к изотипу IgG1 человека.

35. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-33, где указанная переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, и указанная переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи.

36. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по п.35, где 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.

37. Выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-33, где указанное выделенное моноклональное антитело относится к изотипу IgG2 или IgG4 человека.

38. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его связывающий фрагмент, как определено в любом из пп.1-37, и фармацевтически приемлемый носитель.

39. Способ гуманизации антитела мыши, причем указанный способ включает:

- (a) отбор одного или нескольких акцепторных последовательностей 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 характеризуется:

зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 7 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 8;

зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 63 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 64;

зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 91 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 92; или

зрелой переменной областью тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 119 и зрелой переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 120.

40. Применение выделенного моноклонального антитела или его связывающего фрагмента, как определено в любом из пп.1-37, в производстве лекарственного средства для лечения или осуществления профилактики связанного с тау заболевания.

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

42. Применение по п.41, отличающееся тем, что указанное связанное с тау заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

43. Способ обнаружения отложений тау-белка у субъекта, страдающего от или подверженного риску развития заболевания, связанного с агрегацией или накоплением тау, включающий введение указанному субъекту выделенного моноклонального антитела или его связывающего фрагмента, как определено в любом из пп.1-37, и обнаружение выделенного моноклонального антитела или его связывающего фрагмента, связавшегося с тау, у указанного субъекта.

44. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 14, 15 и 16, антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-8.

45. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 68, 69 и 70, антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.9-17.

46. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 96, 97 и 98, антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.18-26.

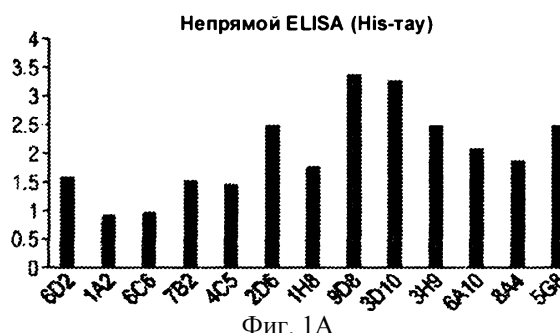
47. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 124, 125 и 126, антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.27-33.

48. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 17, 12 и 13, антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-8.

49. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 71, 66 и 67, антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.9-17.

50. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 99, 94 и 95, антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.18-26.

51. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи согласно Кэботу SEQ ID NO: 127, 122 и 123, антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.27-33.



Фиг. 1А



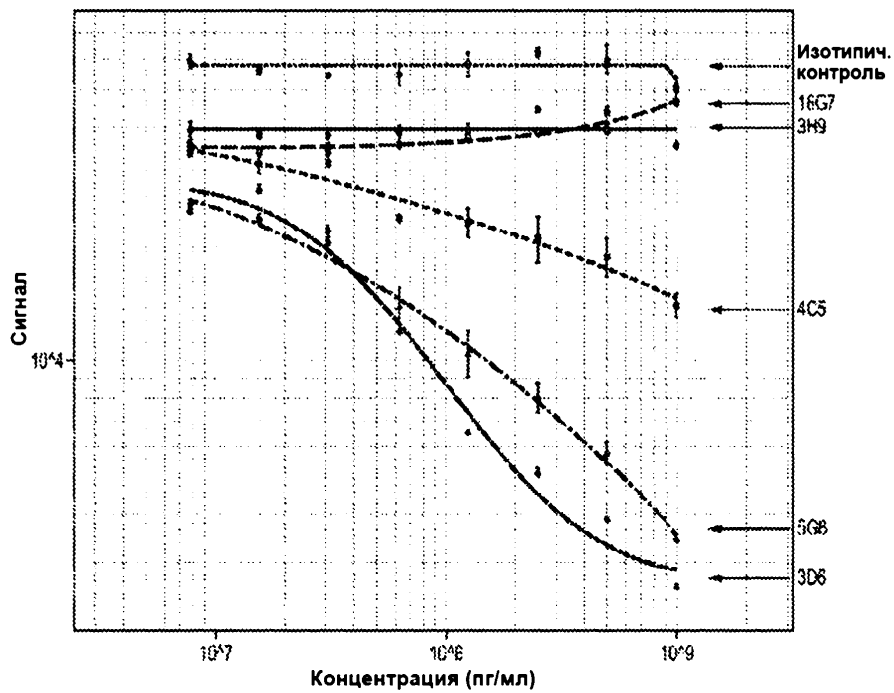
Фиг. 1В



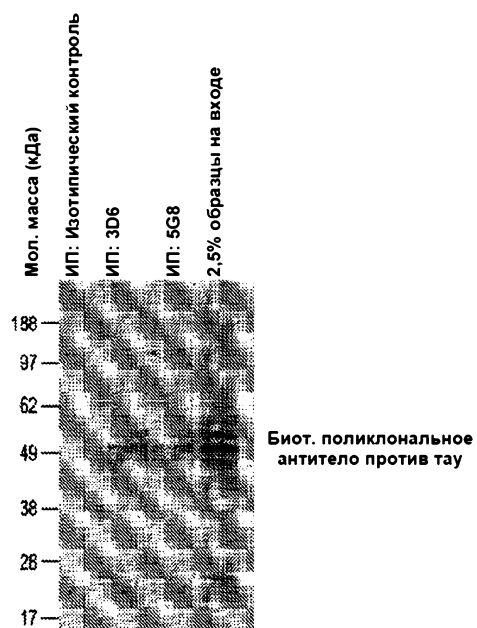
Фиг. 1С

Название	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (нМ)
3D6	2.58×10^6	1.19×10^{-3}	0.46
1H6	5.07×10^6	5.61×10^{-3}	11.1
3H9	4.71×10^6	1.41×10^{-3}	3.0
5G8	3.75×10^6	2.54×10^{-3}	6.78
6D2	3.83×10^6	3.18×10^{-3}	8.29
7G6	5.76×10^6	3.32×10^{-3}	5.77
8A4	5.99×10^6	2.27×10^{-3}	3.8

Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

	10	20	30	40	
5G8-VH	E V Q L Q Q S G A E L V R S G A S V R L S C T A S G F N I K D Y Y M H W V R Q R				40
aDabi-Fab2b-VH	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T D Y Y M H W V R Q A				40
hu5G8-VH_v1	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G F N I K D Y Y M H W V R Q A				40
hu5G8-VH_v2	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G F N I K D Y Y M H W V R Q A				40
hu5G8-VH_v3	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G F N I K D Y Y M H W V R Q A				40
hu5G8-VH_v4	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G F N I K D Y Y M H W V R Q A				40
hu5G8-VH_v5	E V Q L V Q S G A E L V K P G A S V R L S C K A S G F N I K D Y Y M H W V R Q A				40
hu5G8-VH_v6	E V Q L V Q S G A E L V K P G A S V R L S C A A S G F N I K D Y Y M H W V R Q A				40
hu5G8-VH_v7	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G F N I K D Y Y M H W V R Q A				40
hu5G8-VH_v8	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G F N I K D Y Y M H W V R Q A				40
	50	60	70	80	
5G8-VH	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T V Y A P K F Q G K A T M T S D T S S N T A Y				80
aDabi-Fab2b-VH	P G Q G L E W M G E T N P R N G G T T Y N E K F K G K A T M T R D T S T S T A Y				80
hu5G8-VH_v1	P G Q G L E W M G W I D P E N G D T V Y A P K F Q G K A T M T R D T S T S T A Y				80
hu5G8-VH_v2	P G Q G L E W I G W I D P E N G D T V Y A P K F Q G K A T M T S D T S T S T A Y				80
hu5G8-VH_v3	P G Q G L E W I G W I D P E N G D T V Y A P K F Q G K A T M T S D T S T S T A Y				80
hu5G8-VH_v4	P G Q G L D W I G W I D P E N G D T V Y A P K F Q G K A T M T S D T S T S T A Y				80
hu5G8-VH_v5	P G Q G L D W I G W I D P E N G D T V Y A P K F Q G K A T M T S D T S T N T A Y				80
hu5G8-VH_v6	P G Q G L D W I G W I D P E N G D T V Y A P K F Q G K A T M T S D T S T N T A Y				80
hu5G8-VH_v7	P G Q G L E W M G W I D P E N G D T V Y A P K F Q G R V T M T R D T S T S T V Y				80
hu5G8-VH_v8	P G Q G L D W I G W I D P E N G D T V Y A P K F Q G R V T M T S D T S T S T V Y				80

Фиг. 5А

	90	100	110	
5G8-VH	L H L S S L T S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L T V T V S S			112 (SEQ ID NO: 7)
aDabi-Fab2b-VH	M E L S S L R S E D T A V Y Y C T I G T S G Y D Y F D Y W G Q G T L V T V S S			119 (SEQ ID NO: 28)
hu5G8-VH_v1	M E L S S L R S E D T A V Y Y C T I - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S			112 (SEQ ID NO: 33)
hu5G8-VH_v2	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S			112 (SEQ ID NO: 34)
hu5G8-VH_v3	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S			112 (SEQ ID NO: 35)
hu5G8-VH_v4	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S			112 (SEQ ID NO: 36)
hu5G8-VH_v5	L E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S			112 (SEQ ID NO: 37)
hu5G8-VH_v6	L E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S			112 (SEQ ID NO: 38)
hu5G8-VH_v7	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S			112 (SEQ ID NO: 39)
hu5G8-VH_v8	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S P - - - - - L D F W G Q G T L V T V S S			112 (SEQ ID NO: 40)

Фиг. 5В

	10	20	30	40	
5G8-VL	D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
aDabi-Fab2b-VL	D I V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C R S S Q S I V H S D G N I Y L E W				40
hu5G8-VL_v1	D I V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu5G8-VL_v2	D V V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu5G8-VL_v3	D V V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu5G8-VL_v4	D V V M T Q S P L S L S V T P G E P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu5G8-VL_v5	D I V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu5G8-VL_v6	D V V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
	50	60	70	80	
5G8-VL	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I				80
aDabi-Fab2b-VL	Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S Y R F S G V P D R F S G S G S G T G F T L K I				80
hu5G8-VL_v1	Y L Q K P G Q S P K L L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T G F T L K I				80
hu5G8-VL_v2	L L Q K P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T G F T L K I				80
hu5G8-VL_v3	L L Q K P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu5G8-VL_v4	L L Q K P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu5G8-VL_v5	Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80
hu5G8-VL_v6	L L Q K P G Q S P Q R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I				80

Фиг. 6А

	90	100	110	
5G8-VL	R R V E A E D L G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 8)
aDabi-Fab2b-VL	S R V E A E D V G V Y Y C F Q A S H V P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 31)
hu5G8-VL_v1	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 41)
hu5G8-VL_v2	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 42)
hu5G8-VL_v3	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 43)
hu5G8-VL_v4	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 44)
hu5G8-VL_v5	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 45)
hu5G8-VL_v6	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T L F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 46)

Фиг. 6В

ФИГ. 8

ФИГ. 9

		10	20	30	40	
Белок 8A4VL	D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W					40
ABA26100	D I V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C R S S Q S L V Y S D G S T W L N W					40
8A4VL_v1	D I V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W					40
8A4VL_v2	D I V M T Q S P L S L S V T L G E P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W					40
8A4VL_v3	D V V M T Q S P L S L S V T L G E P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W					40
		50	60	70	80	
Белок 8A4VL	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I					80
ABA26100	F Q Q R P G Q S P R R L I Y D V S T R D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
8A4VL_v1	F Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
8A4VL_v2	F Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
8A4VL_v3	L Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
		90	100	110		
Белок 8A4VL	S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P C T F G G G T K L E I K					112 (SEQ ID NO: 92)
ABA26100	S R V E A E D V G V Y Y C M Q F I D W P H T F G Q G T K L E I K					112 (SEQ ID NO: 112)
8A4VL_v1	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P C T F G Q G T K L E I K					112 (SEQ ID NO: 116)
8A4VL_v2	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P C T F G Q G T K L E I K					112 (SEQ ID NO: 117)
8A4VL_v3	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P C T F G Q G T K L E I K					112 (SEQ ID NO: 118)

Фиг. 10

		10	20	30	40	
Белок 7G6VH	E V Q L Q Q S G A E L V R P G A L V K L S C K A S G F N I K D Y Y I H W V K Q R					40
3U0T VH	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y Y T E A Y Y I H W V R Q A					40
hu7G6VHv1	Q V Q L V Q S G A E V V K P G A S V K L S C K A S G F N I K D Y Y I H W V R Q A					40
hu7G6VHv2	Q V Q L V Q S G A E V V K P G A S V K L S C K A S G F N I K D Y Y I H W V K Q A					40
		50	60	70	80	
Белок 7G6VH	P E Q G L E W I G W I D P E N G E T V Y D P K F Q G K A S I T S D T S S N T A Y					80
3U0T VH	P G Q G L E W M G R I D P A T G N T K Y A P R L Q D R V T M T R D T S T S T V Y					80
hu7G6VHv1	P G Q G L E W M G W I D P E N G E T V Y D P K F Q G R V T I T R C T S T N T A Y					80
hu7G6VHv2	P G Q G L E W M G W I D P E N G E T V Y D P K F Q G R V T I T R D T S T N T A Y					80
		90	100	110		
Белок 7G6VH	L Q L R S L T S E D T A V Y Y S T S L D - - - F W G Q G T T V T V S S					112
3U0T VH	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A S L Y S L P V Y W G Q G T T V T V S S					116
hu7G6VHv1	L Q L S S L R S E D T A V Y Y S T S L D - - - F W G Q G T T V T V S S					112
hu7G6VHv2	L Q L S S L R S E D T A V Y Y S T S L D - - - F W G Q G T T V T V S S					112

Фиг. 11

		10	20	30	40	
Белок 7G6VL	D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W					40
3U0T VL	D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L Y S D A K T Y L N W					40
hu7G6VLv1	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W					40
hu7G6VLv2	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W					40
hu7G6VLv3	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W					40
hu7G6VLv4	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W					40
hu7G6VLv5	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W					40
hu7G6VLv6	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W					40
hu7G6VLv7	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W					40
hu7G6VLv8	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S T Q S L L D S D G K T Y L N W					40
		50	60	70	80	
Белок 7G6VL	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I					80
3U0T VL	F Q Q R P G Q S P R R L I Y Q I S R L D P G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
hu7G6VLv1	F Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
hu7G6VLv2	F L Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
hu7G6VLv3	L Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
hu7G6VLv4	L L Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
hu7G6VLv5	F Q Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
hu7G6VLv6	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
hu7G6VLv7	F Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80
hu7G6VLv8	L L Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					80

Фиг. 12А

	90	100	110	
Белок 7G6VL	S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K			112 (SEQ ID NO: 120)
3U0T VL	S R V E A E D V G V Y Y C L Q G T H Y P V L F G Q G T R L E I K R			113 (SEQ ID NO: 138)
hu7G6VLv1	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R			113 (SEQ ID NO: 141)
hu7G6VLv2	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R			113 (SEQ ID NO: 142)
hu7G6VLv3	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R			113 (SEQ ID NO: 143)
hu7G6VLv4	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R			113 (SEQ ID NO: 144)
hu7G6VLv5	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R			113 (SEQ ID NO: 145)
hu7G6VLv6	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G Q G T K L E I K R			113 (SEQ ID NO: 146)
hu7G6VLv7	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K R			113 (SEQ ID NO: 147)
hu7G6VLv8	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K R			113 (SEQ ID NO: 148)

Фиг. 12В

