

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390144 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.24

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.06.23(54) ВЫСОКОАФФИННЫЕ АНТИТЕЛА, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ТАУ,
ФОСФОРИЛИРОВАННЫЙ ПО СЕРИНУ 413

(31) 63/044,291

(32) 2020.06.25

(33) US

(86) PCT/US2021/038591

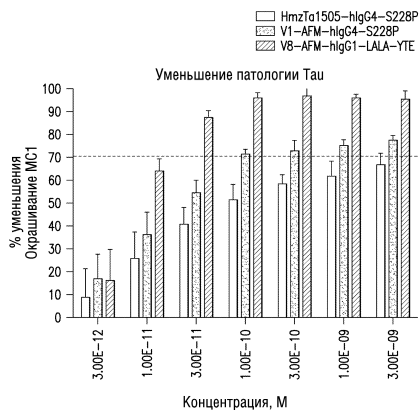
(87) WO 2021/262791 2021.12.30

(71) Заявитель:
МЕРК ШАРП И ДОУМ ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
Бейкер Джинн Э., Парментье Баттёр
Софи, Чэнь Мин-Тан, Чэн Алан К.,
Хсиех Чунг-Минг, Мечковски Карл,
Суон Сокрейн (US)

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

(57) В изобретении представлены высокоаффинные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с тау-pS413 человека. Также представлены композиции, наборы, способы и варианты применения, предусматривающие такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.



A1

202390144

202390144

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576882EA/23

ВЫСОКОАФФИННЫЕ АНТИТЕЛА, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ТАУ, ФОСФОРИЛИРОВАННЫЙ ПО СЕРИНУ 413

Ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 63/044291, поданной 25 июня 2020 года, раскрытие которой полностью включено посредством ссылки.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к высокоаффинным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с тау-pS413 (например тау человека, имеющими аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, фосфорилированную по серину 413). Изобретение также относится к композициям, наборам, способам и вариантам применения, предусматривающим высокоаффинные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Тау представляет собой белок, кодируемый геном MAPT, который в геноме человека находится в хромосоме 17 (17q21). Тау-белок является одним из связывающих микротрубочки белков, в большом количестве экспрессирующихся в центральной нервной системе. Было обнаружено, что тау является основным составляющим белком в парных спиральных филаментах и прямых филаментах, образующих нейрофибриллярные клубки (NFT) при болезни Альцгеймера (AD), одном из наиболее известных нейродегенеративных заболеваний, и его внутриклеточное накопление было продемонстрировано при различных невропатологических состояниях. Заболевания, вызванные таким внутриклеточным накоплением тау, совместно именуются «тауопатиями» (Tetsuaki Arai, «Shinkei Naika» (документ Японии), Vol.72, специальный номер, (Suppl.6), 2010, pp.46-51). Тауопатии включают нейродегенеративные заболевания, такие как AD, кортикобазальная дегенерация (CBD) или кортикобазальный синдром (CBS), прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Пика, деменция с агриофильной зернистостью (заболевание с агриофильной зернистостью), множественная системная таупатия с деменцией (MSTD), лобно-височная деменция и паркинсонизм, сцепленные с хромосомой 17 (FTDP-17), деменция с нейрофибриллярными клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцинозом (DNTC), таупатия белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI), лобно-височная долевая дегенерация с тау-положительными включениями (FTLD-тау). Тауопатиями также включают ненейродегенеративные заболевания, включая: инфекционные заболевания, такие как последствия энцефалита Экономо и подострый склерозирующий панэнцефалит; и вызванные травмой состояния, такие как энцефалопатия боксеров (Tetsuaki Arai, «Shinkei Naika» (документ Японии), Vol.72, специальный номер, (Suppl.6), 2010, pp.46-51).

Тау может быть фосфорилирован по большому количеству аминокислотных остатков, и считается, что фосфорилированный тау является патологическим видом тау при тауопатиях. Несмотря на то, что в данной области известно много сайтов фосфорилирования тау и антител против тау с различной специфичностью (например нацеленный на общий тау, нефосфорилированный тау или тау, фосфорилированный по различным аминокислотным остаткам), до сих пор неясно, какие виды фосфорилированных тау является лучшей мишенью для лечения таупатии. Среди известных антител против тау, одни не различают патологические виды тау (например тау в головном мозге пациентов с AD) и нормальный тау (например тау в головном мозге здоровых людей), а другие не обладают достаточно высокой аффинностью, и поэтому их нужно вводить в очень высоких дозах для достижения эффективного количества в головном мозге. Таким образом, существует неудовлетворенная потребность в получении высокоаффинных антител против тау, которые специфически нацелены на патологические виды тау (например тау-pS413).

Сущность настоящего изобретения

В настоящем раскрытии представлены высокоаффинные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тау-pS413 человека (например тау, имеющими аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, фосфорилированную по серину 413). Также в данном документе представлены выделенные нуклеиновые кислоты и векторы, содержащие полинуклеотидные последовательности, кодирующие такие высокоаффинные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, клетки (например клетки-хозяева), содержащие такие выделенные нуклеиновые кислоты или векторы, композиции или наборы, содержащие такие высокоаффинные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и способы или варианты применения, предусматривающие такие высокоаффинные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

В одном аспекте в данном документе представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит определяющую комплементарность область 1 вариабельной области тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41; определяющую комплементарность область 2 вариабельной области тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; и определяющую комплементарность область 3 вариабельной области тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и определяющую комплементарность область 1 вариабельной области легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29; определяющую комплементарность область 2 вариабельной области легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30; и определяющую комплементарность область 3

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47; и VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29; VL-CDR2, содержащую

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36.

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую аминокислотную

В различных вариантах осуществления антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с тау-pS413, раскрытого в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60. В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61. В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64. В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65. В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68.

фрагмент состоит из двух легких цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и двух тяжелых цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоит из двух легких цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и двух тяжелых цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоит из двух легких цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и двух тяжелых цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоит из двух легких цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:71, и двух тяжелых цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:72.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоит из двух легких цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:73, и двух тяжелых цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:74.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоит из двух легких цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:75, и двух тяжелых цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:76.

В различных вариантах осуществления антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 1×10^{-8} М или менее для тау-рS413. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 9×10^{-9} М или менее для тау-рS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 8×10^{-9} М или менее для тау-рS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 7×10^{-9} М или менее для тау-рS413. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 6×10^{-9} М или менее для тау-рS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 5×10^{-9} М или менее для тау-рS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 4×10^{-9} М или менее для тау-рS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 3×10^{-9} М или менее для тау-

pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 2×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В некоторых вариантах осуществления KD измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с иммобилизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В одном варианте осуществления KD измеряют с помощью Biacore. В другом варианте осуществления KD измеряют с помощью KinExA.

В другом аспекте представлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая различные полипептиды, раскрытые в данном документе.

В определенных вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует VH различных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует VL различных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. В других вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует VH и VL различных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе.

В определенных вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь различных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь различных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. В других вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь и легкую цепь различных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе.

В другом аспекте представлен вектор экспрессии, содержащий различные выделенные нуклеиновые кислоты, раскрытые в данном документе.

В еще одном аспекте представлена клетка-хозяин, содержащая одну или несколько различных выделенных нуклеиновых кислот или один или несколько различных векторов экспрессии, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит одну или несколько различных выделенных нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе. В других вариантах осуществления клетка-хозяин содержит один или несколько различных векторов экспрессии, раскрытых в данном документе.

В еще одном аспекте представлен способ получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления способ получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, включает экспрессию выделенной нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, в условиях экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления способ получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, включает экспрессию вектора экспрессии, описанного в данном документе, в

условиях экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В других вариантах осуществления способ получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, включает культивирование клетки-хозяина, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии, описанный в данном документе, в условиях экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В другом аспекте представлена композиция, содержащая антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит дополнительное средство.

В отдельных вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, эффективное для лечения того же или другого заболевания, для лечения которого используют антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, эффективное для смягчения одного или нескольких побочных эффектов антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. Иллюстративные дополнительные средства включают без ограничения: ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты рецепторов HMDA (такие как мемантин), ингибиторы агрегации бета-амилоидных пептидов, антиоксиданты, модуляторы гамма-секретазы, имитаторы фактора роста нервов (NGF) или генную терапию NGF, агонисты PPAR γ , ингибиторы HMS-CoA-редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецепторов GABA, ингибиторы киназы гликогенсинтазы, внутривенный иммуноглобулин, агонисты мускариновых рецепторов, модуляторы никотиновых рецепторов, активный или пассивный бета-амилоидный пептид для иммунизации, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты серотониновых рецепторов, антитела против бета-амилоидного пептида, гормон роста, нейротрофический фактор, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-4/5, фактор роста фибробластов (FGF)-2 и другие FGF, нейротрофин (NT)-3, эритропоэтин (EPO), фактор роста гепатоцитов (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF)- α 1, TGF-бета, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейтурин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), херегулин, нейрегулин, артемин, персефин, интерлейкины, нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GFR), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (CSF), гранулоцитарно-макрофагальный CSF, нетрины, кардиотрофин-1, белки hedgehog, фактор ингибирования лейкемии (LIF), мидкин, плейотрофин, костные морфогенетические белки (BMP), нетрины, сапозины, семафорины, фактор стволовых клеток (SCF) или другое антитело против тау.

В другом аспекте представлен набор, содержащий антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе.

В еще одном аспекте представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту дополнительного средства.

В отдельных вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, эффективное для лечения того же или другого заболевания, для лечения которого используют антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, эффективное для смягчения одного или нескольких побочных эффектов антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. Иллюстративные дополнительные средства включают без ограничения: ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты рецепторов HMDA (такие как мемантин), ингибиторы агрегации бета-амилоидных пептидов, антиоксиданты, модуляторы гамма-секретазы, имитаторы фактора роста нервов (NGF) или генную терапию NGF, агонисты PPAR γ , ингибиторы HMS-CoA-редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецепторов GABA, ингибиторы киназы гликогенсинтазы, внутривенный иммуноглобулин, агонисты мускариновых рецепторов, модуляторы никотиновых рецепторов, активный или пассивный бета-амилоидный пептид для иммунизации, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты серотониновых рецепторов, антитела против бета-амилоидного пептида, гормон роста, нейротрофический фактор, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-4/5, фактор роста фибробластов (FGF)-2 и другие FGF, нейротрофин (NT)-3, эритропоэтин (EPO), фактор роста гепатоцитов (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF)- α 1, TGF-бета, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейтурин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), херегулин, нейрегулин, артемин, персефин, интерлейкины, нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GFR), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (CSF), гранулоцитарно-макрофагальный CSF, нетрины, кардиотрофин-1, белки hedgehog, фактор ингибирования лейкемии (LIF), мидкин, плейотрофин, костные морфогенетические белки (BMP), нетрины, сапозины, семафорины, фактор стволовых клеток (SCF) или другое антитело против тау.

В некоторых вариантах осуществления способа таупатия представляет собой нейродегенеративное заболевание, включая без ограничения такие заболевания, как болезнь Альцгеймера (AD), кортикобазальная дегенерация (CBD) или кортикобазальный синдром (CBS), прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Пика, деменция с

агрирофильной зернистостью (заболевание с агрирофильной зернистостью), множественная системная таупатия с пресенильной деменцией (MSTD), лобно-височная деменция и паркинсонизм, сцепленные с хромосомой 17 (FTDP-17), деменция с нейрофибриллярными клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцинозом (DNTC), таупатия белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI) или лобно-височная долевая дегенерация с патологией тау (FTLD-тау). В одном варианте осуществления таупатия представляет собой AD. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой CBD. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой болезнь Пика. В одном варианте осуществления таупатия представляет собой деменцию с агрирофильной зернистостью. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой MSTD. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой FTDP-17. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой деменцию с нейрофибриллярными клубками. В одном варианте осуществления таупатия представляет собой DNTC. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой WMT-GGI. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой FTLD-тау.

В других вариантах осуществления способа таупатия представляет собой ненейродегенеративное заболевание, включая без ограничения инфекционные заболевания, такие как последствия энцефалита Экономо и подострый склерозирующий панэнцефалит и вызванные травмой состояния, такие как энцефалопатия боксеров. В одном варианте осуществления таупатия представляет собой последствия энцефалита Экономо. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой подострый склерозирующий панэнцефалит. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой энцефалопатию боксеров.

В еще одном аспекте представлен способ уменьшения количества тау-pS413 в головном мозге субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту дополнительного средства.

В отдельных вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, эффективное для лечения того же или другого заболевания, для лечения которого используют антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, эффективное для смягчения одного или нескольких побочных эффектов антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. Иллюстративные дополнительные средства включают без ограничения: ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты рецепторов HMDA (такие как мемантин), ингибиторы агрегации бета-

амилоидных пептидов, антиоксиданты, модуляторы гамма-секретазы, имитаторы фактора роста нервов (NGF) или генную терапию NGF, агонисты PPAR γ , ингибиторы HMS-CoA-редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецепторов GABA, ингибиторы киназы гликогенсинтазы, внутривенный иммуноглобулин, агонисты мускариновых рецепторов, модуляторы никотиновых рецепторов, активный или пассивный бета-амилоидный пептид для иммунизации, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты серотониновых рецепторов, антитела против бета-амилоидного пептида, гормон роста, нейротрофический фактор, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-4/5, фактор роста фибробластов (FGF)-2 и другие FGF, нейротрофин (NT)-3, эритропоэтин (EPO), фактор роста гепатоцитов (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF)- α 1, TGF-бета, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейтурин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), херегулин, нейрегулин, артемин, персефин, интерлейкины, нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GFR), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (CSF), гранулоцитарно-макрофагальный CSF, нетрины, кардиотрофин-1, белки hedgehog, фактор ингибирования лейкемии (LIF), мидкин, плейотрофин, костные морфогенетические белки (BMP), нетрины, сапозины, семафорины, фактор стволовых клеток (SCF) или другое антитело против тау.

В дополнительных вариантах осуществления представлено применение антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, для лечения таупатии у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления представлено применение антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, для лечения таупатии у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления представлено применение антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, для получения лекарственного средства для лечения таупатии у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления различных вариантов применения, описанных в данном документе, таупатия представляет собой такие заболевания, как болезнь Альцгеймера, кортикобазальная дегенерация, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Пика, деменция с агриофильной зернистостью (заболевание с агриофильной зернистостью), множественная системная таупатия с пресенильной деменцией (MSTD), лобно-височная деменция и паркинсонизм, сцепленные с хромосомой 17 (FTDP-17), деменция с нейрофибриллярными клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцинозом (DNHC), таупатия белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI), лобно-височная долевая дегенерация с патологией тау (FTLD-тау), последствия энцефалита Экономо, подострый склерозирующий панэнцефалит или энцефалопатия боксеров. В одном варианте

осуществления таупатия представляет собой AD. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой CBD. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой болезнь Пика. В одном варианте осуществления таупатия представляет собой деменцию с агрирофильной зернистостью. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой MSTD. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой FTDP-17. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой деменцию с нейрофибриллярными клубками. В одном варианте осуществления таупатия представляет собой DNTC. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой WMT-GGI. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой FTLD-тау. В одном варианте осуществления таупатия представляет собой последствия энцефалита Экономо. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой подострый склерозирующий панэнцефалит. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой энцефалопатию боксеров.

В дополнительном варианте осуществления представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытый в данном документе, для применения в способе лечения таупатии у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытый в данном документе, для применения в способе диагностики таупатии у субъекта.

Краткое описание чертежей

На **фиг. 1А** и **1В** показано выравнивание аминокислотных последовательностей VH (**фиг. 1А**) и VL (**фиг. 1В**) иллюстративных антител, описанных в данном документе. CDR, показанные на этих фигурах, соответствуют системе нумерации Kabat.

На **фиг. 2А-2F** показано, что иллюстративные высокоаффинные антитела против тау-pS413 V8-AFM и V5-AFM специфически связываются с пептидом тау-pS413. V8-AFM (например V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE, V8-AFM-hIgG1-LALA, V8-AFM-hIgG4-S228P) и V5-AFM (например V5-AFM-hIgG4-S228P) связываются с пептидом, который имеет фосфорилированный серин 413 (**фиг. 2А**), но не связываются с тем же пептидом без фосфорилированного серина 413 (**фиг. 2В**), или с пептидами, которые фосфорилированы в других положениях в тау-белке (**фиг. 2С-2F**).

На **фиг. 3А** и **3В** показан конкурентный иммуноанализ тау-pS413, демонстрирующий связывание различных иллюстративных антител против тау-pS413 с гомогенатами головного мозга пациентов с AD. На **фиг. 3А** показан репрезентативный график аппроксимации кривой с OD 450 нм в качестве показаний и hIgG в качестве изотипического контроля. На **фиг. 3В** показан репрезентативный график аппроксимации кривой с % занятости в качестве показаний.

На **фиг. 4А-4Е** показано, что иммуноистощение экстракта P2 гомогенатов головного мозга при AD различными иллюстративными антителами против тау-pS413

предотвращает индукцию патологии тау в нейронах hiPSC. На **фиг. 4А** показано схематичное изображение протокола нейтрализации. На **фиг. 4В** и **4С** показаны данные AlphaLISA®, использованные для подтверждения успешного истощения тау-pS413 и общего тау, соответственно. На **фиг. 4D** показаны репрезентативные изображения, демонстрирующий патологический тау-MC1 (красные пятна) в нейронах, обработанных фракцией P2 (правая панель), по сравнению с контролем без обработки (левая панель). На **фиг. 4Е** показан анализ изображения с большим содержанием патологии тау-MC1 в нейронах hiPSC через 5 дней после посева с иммуноистощенными фракциями P2, полученными из головного мозга при AD, с различной концентрацией иллюстративных антител против тау-pS413 или контрольным IgG.

На **фиг. 5** показан дозозависимый ответ при введении иллюстративных высокоаффинных антител V8-AFM-mIgG1 против тау-pS413 по сравнению с исходными мышинными антителами pTa1505-mIgG1 против тау-pS413 со снижением патологии тау.

На **фиг. 6** показано, что V6-AFM-hIgG1-LALA-YTE, который содержит мутацию K54E в VH, имеет улучшенную выработку молекул антител по сравнению с V1-AFM-hIgG1-LALA-YTE, который не содержит мутации K54E в своей VH.

На **фиг. 7А** и **7В** показано взаимодействие V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE с мишенью ex vivo в образцах CSF пациентов с AD или людей без AD. На **фиг. 7А** показаны значения A.U. В анализе MSD tau-pS413 для образцов CSF пациентов с AD или людей без AD в присутствии повышенной концентрации V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE. На **фиг. 7В** показан процент снижения содержания свободного тау-pS413 (несвязанного с V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE) в образцах CSF пациентов с AD или людей без AD.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Сокращения

В подробном описании и примерах изобретения использованы следующие сокращения:

ADCC Антителозависимая клеточная цитотоксичность

CDC Комплементзависимая цитотоксичность

CDR Определяющая комплементарность область в переменных областях иммуноглобулина

СНО Яичники китайского хомяка

EC50 Концентрация, приводящая к 50% эффективности или связыванию

ELISA Иммуноферментный анализ

FR Каркасная область антитела: переменные области иммуноглобулина за исключением областей CDR.

IC50 концентрация, приводящая к 50% ингибированию

IgG Иммуноглобулин G

Kabat Система выравнивания и нумерации иммуноглобулинов, впервые предложенная Элвином А. Кабатом ((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)

mAb Моноклональное антитело

PK Фармакокинетика

V-область Сегмент цепей IgG с последовательностью, варьирующей между разными антителами. Он проходит до остатка 109 в легкой цепи и до остатка 113 в тяжелой цепи по Kabat.

VH Вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина

VL Вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина

Определения

Чтобы изобретение было более понятным, некоторые технические и научные термины конкретно определены ниже. Если в этом документе специально не указано иное, все другие технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, обычно понятное специалистам в области техники, к которой относится данное изобретение.

В рамках настоящего изобретения, включая прилагаемую формулу изобретения, формы единственного числа слов включают соответствующие ссылки во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Точно так же формы множественного числа слов включают соответствующие ссылки в единственном числе, если из контекста явно не следует иное.

Термин «тау-белок» при использовании в контексте человеческого вида относится к шести изоформам человеческого тау-белка, имеющим аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO:1-6, то есть 4R2N (приведенные в SEQ ID NO:1), 4R1N (приведенные в SEQ ID NO:2), 4R0N (приведенные в SEQ ID NO:3), 3R2N (приведенные в SEQ ID NO:4), 3R1N (приведенные в SEQ ID NO:5) и 3R0N (приведенные в SEQ ID NO:6), а также варианты их генов. Тау-белок согласно настоящему изобретению также включает белки, имеющие сходство или идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью человеческого тау-белка, приведенной в SEQ ID NO:1, в соответствии с методом BLAST (в условиях PBLAST по умолчанию, представленными NCBI), и их изоформы. Такие тау-белки также включают тау-белки, происходящие из нечеловеческих видов, таких как шимпанзе, макаки, лошади, свиньи, собаки, мыши, кролики и крысы. Можно получить терапевтическое или профилактическое средство, нацеленное на тау-белок, полученный из такого животного, отличного от человека, с целью улучшения когнитивной функции животного-мишени.

Термин «тау-пептид», использованный в данном документе, означает пептид, содержащий часть аминокислотной последовательности тау-белка. Положение тау-пептида, полученного из тау-белка, не следует ограничивать. Длину тау-пептида также не следует ограничивать, но предпочтительно он должен иметь длину аминокислот, равную четырем или более, в частности, шести или более, более конкретно, восемью или более.

Используемый в данном документе термин «тау» означает тау-белок или тау-пептид в совокупности.

В контексте настоящего изобретения положение аминокислотного остатка в тау-

белке или тау-пептиде обозначено номером аминокислоты, который определен на основе аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:1 для уточнения. Например, «серин 413» «Ser413» или «S413» относится к аминокислотному остатку, соответствующему Ser413 в SEQ ID NO:1, включая остаток серина в положении аминокислоты 413 в SEQ ID NO:1 (4R2N), положении аминокислоты 384 в SEQ ID NO:2 (4R1N), положении аминокислоты 355 в SEQ ID NO:3 (4R0N), положении аминокислоты 382 в SEQ ID NO:4 (3R2N), положении аминокислоты 353 в SEQ ID NO:5 (3R1N) или положении аминокислоты 324 в SEQ ID NO:6 (3R0N). Соответствие положений аминокислотных остатков между изоформами тау показано в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Изоформы человеческого тау-белка

Изоформа	4R2N	4R1N	4R0N	3R2N	3R1N	3R0N
Последовательность	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
Аминокислотный остаток	Положение/номер аминокислоты					
Asn	410	381	352	379	350	321
Val	411	382	353	380	351	322
Ser	412	383	354	381	352	323
Ser	413	384	355	382	353	324
Thr	414	385	356	383	354	325
Gly	415	386	357	384	355	326
Ser	416	387	358	385	356	327
Ile	417	388	359	386	357	328
Asp	418	389	360	387	358	329
Met	419	390	361	388	359	330
Val	420	391	362	389	360	331
Asp	421	392	363	390	361	332

Хотя в **таблице 1** показаны положения аминокислотных остатков указанных изоформ, соответствующие положениям 410-421 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:1, соответствие положений аминокислотных остатков в других областях можно легко распознать на основе, например, фиг. 1A и 1B WO 2018/254390, полное раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки. Чтобы узнать соответствующие положения аминокислот в изоформах или гомологах, специалист в данной области может провести анализ с использованием парного выравнивания последовательностей, например по методу Нидлмана-Вунша или по методу Смита-Уотермана, или с использованием множественного выравнивания последовательностей, например по методу ClustalW или по методу PRRP. В качестве примера анализа

соответствующих положений на фиг. 1A и 1B WO 2018/254390 показано выравнивание аминокислотных последовательностей шести изоформ человека (обозначенных однобуквенным кодом) на основе ClustalW. Эти фигуры показывают, что структура, окружающая аминокислотный остаток, соответствующий Ser413 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:1, является консервативной среди шести изоформ, а также помогают идентифицировать аминокислоты, соответствующие друг другу.

В рамках настоящего изобретения утверждение, что аминокислотный остаток «фосфорилирован» означает, что фосфатная группа связана сложноэфирной связью с боковой цепью аминокислотного остатка. Иллюстративные аминокислотные остатки, которые могут быть фосфорилированы, включают серин (Ser), треонин (Thr) и тирозин (Tyr).

Термин «тау-pS413» «тау-PS413» «тау-pSer413» «pS413-тау» «PS413-тау» или «pSer413-тау» в рамках настоящего изобретения относится к тау-белку или пептиду, фосфорилированному по аминокислотному остатку, соответствующему Ser413 в SEQ ID NO:1, включая остаток серина в положении аминокислоты 413 в SEQ ID NO:1 (4R2N), положении аминокислоты 384 в SEQ ID NO:2 (4R1N), положении аминокислоты 355 в SEQ ID NO:3 (4R0N), положении аминокислоты 382 в SEQ ID NO:4 (3R2N), положении аминокислоты 353 в SEQ ID NO:5 (3R1N) или положении аминокислоты 324 в SEQ ID NO:6 (3R0N). В некоторых вариантах осуществления тау-pS413 фосфорилирован только в S413. В определенных вариантах осуществления тау-pS413 фосфорилирован по S413 и одному или нескольким дополнительным аминокислотным остаткам.

«Антитело против тау-pS413» в рамках настоящего изобретения относится к антителу, которое специфически связывается с белком тау-pS413 или пептидом тау-pS413.

Каждый из терминов «V1-AFM» «V2-AFM» «V3-AFM» «V4-AFM» «V5-AFM» «V6-AFM» «V7-AFM» или «V8-AFM» в рамках настоящего изобретения относится к варианту HmzTa1505-hIgG4-S228P с созревшей аффинностью, как описано в данном документе, содержащему определенные VH и VL, как описано в таблице 4, с SEQ ID NO, раскрытыми в таблицах 5 и 6. Каждый термин включает антитела с любой из известных константных областей тяжелой цепи (например IgG1, IgG1-LALA, IgG1-LALA-YTE, IgG2, IgG3, IgG4, IgG4-S228P и так далее) или их варианты и любой из известных константных областей легкой цепи (например лямбда или каппа) или их варианты.

Термины «связывает» или «связывание» относятся к взаимодействию между молекулами, включая, например, образование комплекса. Взаимодействия могут быть, например, нековалентными взаимодействиями, включая водородные связи, ионные связи, гидрофобные взаимодействия и/или взаимодействия Ван-дер-Вальса. Комплекс также может включать связывание двух или более молекул, удерживаемых вместе ковалентными или нековалентными связями, взаимодействиями или силами. Сила суммарных нековалентных взаимодействий между одним антигенсвязывающим участком на антителе и одним эпитопом молекулы-мишени, такой как тау, представляет собой

«аффинность» антитела или функционального фрагмента к этому эпитопу или мишени. Если не указано иное, в рамках настоящего изобретения «аффинность связывания» относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например антитело и антиген). Отношение скорости диссоциации (k_{off}) к скорости ассоциации (k_{on}) антитела с моновалентным антигеном (k_{off}/k_{on}) представляет собой «константу диссоциации» (или «равновесную константу диссоциации» используемую взаимозаменяемо) KD , которая находится в обратной зависимости от аффинности. Чем ниже значение KD , тем выше аффинность антитела. Значение KD различно для разных комплексов антитело-антиген и зависит как от k_{on} , так и от k_{off} . Константу диссоциации KD для антитела, представленного в настоящем документе, можно определить с использованием любого способа, представленного в настоящем документе, или любого другого метода, хорошо известного специалистам в данной области, такого как анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR), включая без ограничения Biacore и KinExA. Аффинность к одному сайту связывания не всегда отражает истинную силу взаимодействия между антителом и антигеном. Когда сложные антигены, содержащие несколько повторяющихся антигенных детерминант, таких как поливалентный антиген, вступают в контакт с антителами, содержащими несколько сайтов связывания, взаимодействие антитела с антигеном в одном сайте увеличивает вероятность реакции во втором сайте. Сила таких множественных взаимодействий между мультивалентным антителом и антигеном называется «авидностью». Авидность антитела может быть лучшим показателем его связывающей способности, чем аффинность его отдельных сайтов связывания. Например, высокая авидность может компенсировать низкую аффинность, как это иногда бывает с пентамерными антителами IgM, которые могут иметь более низкую аффинность, чем IgG, но высокая авидность IgM, обусловленная его поливалентностью, позволяет ему эффективно связывать антиген. Если не указано иное, термин «аффинность» или «аффинность связывания» в рамках настоящего изобретения относится к моновалентному (1:1) взаимодействию между антителом против тау-pS413 и белком или пептидом тау-pS413. KD можно измерить с помощью SPR либо с иммобилизованным антителом против тау-pS413, либо с иммобилизованным тау-pS413. Значения KD , раскрытые в данном описании, измерены с иммобилизованным антителом против тау-pS413.

Термины «антитела, которые специфически связываются с тау-pS413», «антитела, которые специфически связываются с белком или пептидом тау-pS413» и аналогичные термины использованы в данном документе взаимозаменяемо и относятся к антителам, которые специфически связываются с полипептидом тау-pS413, например в виде белка или пептида тау-pS413 (например тау-pS413 человека, такого как белок или пептид тау-pS413 человека). Антитело, которое специфически связывается с тау-pS413 (например человеческим тау-pS413), может перекрестно реагировать с тау-pS413, происходящим из другого вида (например тау-pS413 яванского макака). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с тау-pS413, не вступает в

перекрестную реакцию с другими белками или пептидами [тау], такими как белок или пептид тау, не фосфорилированный по S413, или белок или пептид тау, фосфорилированный по другому аминокислотному остатку, отличному от S413. Антитело, которое специфически связывается с тау-pS413, может быть идентифицировано, например, с помощью иммуноанализа, Biacore или других методов, известных специалистам в данной области. Антитело специфически связывается с тау-pS413, когда оно связывается с тау-pS413 с более высокой аффинностью, чем с любым перекрестно-реактивным белком или пептидом, что определяют с использованием экспериментальных методов, таких как радиоиммуноанализ (МА) и иммуноферментный анализ (ELISA). Как правило, специфическая реакция будет по меньшей мере в два раза выше фонового сигнала или шума и может быть более чем в 10 раз выше фона. Для обсуждения специфичности антител см., например, *Fundamental Immunology* 332-36 (Paul ed., 2d ed. 1989). Что касается связывания антитела с молекулой-мишенью, термин «специфическое связывание», «специфически связывается» или «является специфичным в отношении» конкретного полипептида или эпитопа на конкретном полипептиде-мишени означает связывание, которое измеримо отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание можно измерить, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу аналогичной структуры, не обладающую связывающей активностью. Например, специфическое связывание с мишенью можно определить по конкуренции с контрольной молекулой, похожей на мишень, например, с избытком немеченой мишени. В этом случае на специфическое связывание указывают, если связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени.

«Введение» применительно к животному, человеку, субъекту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости относится к контакту экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического средства или композиции с животным, человеком, субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью.

Термин «субъект» включает любой организм, предпочтительно животное, более предпочтительно млекопитающее (например человека, крысу, мышь, собаку, кошку или кролика). В предпочтительном варианте осуществления термин «субъекты» относится к человеку.

Термины «антитело», «иммуноглобулин» или «Ig» использованы в данном документе взаимозаменяемо в самом широком смысле и конкретно охватывают, например, отдельные моноклональные антитела (включая нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), композиции антител с полиэпитопной или моноэпитопной специфичностью, поликлональные или моновалентные антитела, мультивалентные антитела, мультиспецифические антитела (например биспецифические антитела, если они проявляют желаемую биологическую

активность), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, одноцепочечных антител и фрагментов антител, как описано ниже. Антитело может быть человеческим, гуманизированным, химерным и/или с созревшей аффинностью, а также антителом других видов, например мышинным и кроличьим и т. д. Антитела также включают без ограничения синтетические антитела, рекомбинантно полученные антитела, верблужьи антитела, интратела, антиидиотипические (анти-Id) антитела и функциональные фрагменты (например их антигенсвязывающие фрагменты) любого из вышеперечисленных, которые относятся к части полипептида тяжелой или легкой цепи антитела, которая сохраняет некоторые или всю связывающую активность антитела, из которого был получен фрагмент. Неограничивающие примеры функциональных фрагментов (например их антигенсвязывающие фрагменты) включают одноцепочечные Fv (scFv) (например включая моноспецифические, биспецифические и так далее), Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, F(ab)₂ - фрагменты, фрагменты F(ab')₂, Fv с дисульфидной связью (dsFv), фрагменты Fd, фрагменты Fv, диатело, триатело, тетратело и минитело. В частности, представленные в данном документе антитела включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, например, антигенсвязывающие домены или молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который связывается с белком или пептидом тау-pS413 (например одну или несколько CDR антитела против тау-pS413). Такие фрагменты антител можно найти, например, в Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1989); Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers ed., 1995); Huston et al., 1993, *Cell Biophysics* 22:189-224; Pluckthun and Skerra, 1989, *Meth. Enzymol.* 178:497-515; and Day, *Advanced Immunochemistry* (2d ed. 1990). Представленные в настоящем документе антитела могут относиться к любому классу (например IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) или любому подклассу (например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) молекулы иммуноглобулина.

«Fab-фрагмент» состоит из одной легкой цепи и C_H1 и вариабельных областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи. «Fab-фрагмент» может быть продуктом папаинового расщепления антитела.

Область «Fc» содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены C_H1 и C_H2 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и за счет гидрофобного взаимодействия доменов C_H3.

«Fab'-фрагмент» содержит одну легкую цепь и часть или фрагмент одной тяжелой цепи, которая содержит домен V_H и домен C_H1, а также область между доменами C_H1 и C_H2, так что между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов может образоваться межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы F(ab')₂.

«Фрагмент F(ab')₂» содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами C_H1 и C_H2, так что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, фрагмент AF(ab')₂

состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями. «Фрагмент F(ab')₂» может быть продуктом расщепления антитела пепсином.

«Фрагмент Fv» или «область Fv» содержит переменные области как тяжелой, так и легкой цепей, но не содержит константных областей.

Термин «моноклональное антитело», используемый в данном документе, относится к популяции по существу гомогенных антител, то есть молекулы антител, составляющие популяцию, идентичны по аминокислотной последовательности, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Напротив, обычные (поликлональные) препараты антител обычно включают множество различных антител, имеющих разные аминокислотные последовательности в их переменных доменах, которые часто специфичны для разных эпитопов. Модификатор «моноклональный» указывает на то, что антитело получено из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует толковать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены гибридным методом, впервые описанным Kohler et al. (1975) *Nature* 256: 495, или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). «Моноклональные антитела» также могут быть выделены из библиотек фаговых антител с использованием методов, описанных Clackson et al. (1991) *Nature* 352: 624-628 and Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, for example. See also Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731.

В рамках настоящего изобретения термин «гуманизированное антитело» относится к формам антител, которые содержат последовательности как человеческих, так и нечеловеческих (например мышинных, крысиных) антител. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно из двух переменных доменов, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют петлям нечеловеческого иммуноглобулина, а все или по существу все каркасные области. (FR) участки представляют собой участки последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может необязательно содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина человека (Fc).

Как правило, основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, каждая пара имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает переменную область примерно из 100-110 или более аминокислот, в первую очередь ответственную за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть тяжелой цепи может определять константную область, в первую очередь отвечающую за эффекторную функцию.

«Эффекторные функции» относятся к той биологической активности, которую

приписывают Fc-участку антитела и зависит от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание рецептора Fc; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например рецептора В-клетки); и активацию В-клеток.

Обычно легкие цепи человека классифицируют как легкие цепи каппа и лямбда. Кроме того, тяжелые цепи человека обычно классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В легкой и тяжелой цепях переменная и константная области соединены областью «J», состоящей примерно из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также содержит область «D», состоящую еще примерно из 10 аминокислот. См. в целом, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989).

«Переменная область», «переменный домен» или «V-область» или «V-цепь» в рамках настоящего изобретения означают сегмент цепей IgG, который является переменным по последовательности между различными антителами. «Переменная область» антитела относится к переменной области легкой цепи антитела или переменной области тяжелой цепи антитела либо отдельно, либо в комбинации. Переменная область тяжелой цепи может обозначаться как «VH». Переменная область легкой цепи может обозначаться как «VL». Как правило, переменные области как тяжелой, так и легкой цепей содержат три гиперпеременные области, также называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые расположены внутри относительно консервативных каркасных областей (FR). CDR обычно выровнены по каркасным областям, что позволяет связываться со специфическим эпитопом. Как правило, от N-конца к C-концу переменные домены как легкой, так и тяжелой цепи содержат FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Назначение аминокислот каждому домену, как правило, соответствует определениям Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991) («Kabat 1»); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75 («Kabat 2»); Kabat, et al., (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616 («Kabat 3»); Chothia, et al., (1987) J Mol. Biol. 196:901-917 («Chothia 1») or Chothia, et al., (1989) Nature 342:878-883 («Chothia 2»).

«CDR» относится к одной из трех гиперпеременных областей (H1, H2 или H3) в некаркасной области каркаса β -складки V_H антитела или к одной из трех гиперпеременных областей (L1, L2 или L3) в некаркасной области каркаса β -складки V_L антитела. Соответственно, CDR представляют собой последовательности переменной области, вкрапленные в последовательности каркасной области. Участки CDR хорошо известны специалистам в данной области и были определены, например, Kabat как участки с наибольшей гиперпеременной в переменных доменах антитела (см. Kabat 1-3, выше). Последовательности области CDR также были структурно определены Chothia как те остатки, которые не являются частью консервативного каркаса β -складки и, таким образом, способны адаптироваться к другой конформации (см. Chothia 1-2, выше).

Обе методики Kabat и Chothia для определения последовательностей CDR в переменных областях антител хорошо известны в данной области. Последовательности области CDR также были определены AbM, Contact и IMGT. Положения CDR в переменной области канонического антитела были определены путем сравнения многочисленных структур (Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol. 273:927-48; Morea et al., 2000, Methods 20: 267-79). Поскольку количество остатков в гиперпеременной области различается в разных антителах, дополнительные остатки, относящиеся к каноническим положениям, обычно нумеруются буквами a, b, c и т. д. рядом с номером остатка в схеме нумерации канонической переменной области (Al-Lazikani et al., выше). Подобная номенклатура также хорошо известна специалистам в данной области. Соответствие между системой нумерации, включая, например, нумерацию Kabat и уникальную систему нумерации IMGT, хорошо известно специалистам в данной области и показано ниже в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации IMGT. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Contact. В других вариантах осуществления CDR соответствуют любой системе нумерации, известной специалистам в данной области.

Таблица 2. Соответствие положений аминокислот между системами нумерации CDR

	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
V _H CDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
V _H CDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
V _H CDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
V _L CDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
V _L CDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
V _L CDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

«Консервативно модифицированные варианты» или «консервативная замена» относятся к заменам аминокислот в белке другими аминокислотами, имеющими сходные характеристики (например заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформацию основной цепи и жесткость и так далее), так что изменения часто могут быть сделаны без изменения биологической активности белка. Специалистам в данной области известно, что, как правило, замены отдельных аминокислот в несущественных участках полипептида существенно не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Кроме того, замена структурно или функционально сходных аминокислот с меньшей вероятностью нарушит биологическую активность. Примеры

консервативных замен приведены в таблице 3.

Таблица 3. Примеры консервативных аминокислотных замен

Исходный остаток	Консервативная замена
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Термин «эпитоп» в рамках настоящего изобретения определен в контексте молекулярного взаимодействия между «антигенсвязывающей молекулой», такой как антитело (Ab), и соответствующим ему «антигеном» (Ag). Как правило, «эпитоп» относится к зоне или области антигена, с которой специфически связывается антитело, то есть к зоне или области, находящейся в физическом контакте с антителом. Физический контакт может быть определен с помощью критериев расстояния (например предельного расстояния 4 Å) для атомов в молекулах Ab и Ag. Эпитопы могут быть линейными эпитопами или конформационными эпитопами. Линейные эпитопы образованы непрерывной последовательностью аминокислот в белке. Конформационные эпитопы образованы аминокислотами, прерывистыми в белковой последовательности, но которые сходятся вместе при свертывании белка в его трехмерную структуру. Индуцированные эпитопы образуются, когда трехмерная структура белка находится в измененной конформации, например, после активации или связывания другого белка или лиганда.

«Выделенная нуклеиновая кислота» означает полинуклеотид ДНК или РНК геномного, мРНК, кДНК или синтетического происхождения или некоторую их комбинацию, которая не связана со всем полинуклеотидом или его частью, когда выделенный полинуклеотид существует в природе, или связана с полинуклеотидом, с которым она не связана в природе. Молекулы выделенных нуклеиновых кислот, «содержащие» определенные последовательности нуклеиновых кислот, могут содержать, помимо указанных последовательностей, кодирующие последовательности до десяти или даже до двадцати или более других белков или их частей или фрагментов, или могут содержать функционально связанные регуляторные последовательности, которые регулируют экспрессию кодирующей области указанных последовательностей нуклеиновых кислот и/или могут содержать векторные последовательности или не кодирующие последовательности.

Фраза «регуляторные последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Регуляторные последовательности, подходящие для прокариот, например, содержат промотор, необязательно операторную последовательность и сайт связывания рибосомы. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она помещена в функциональную взаимосвязь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК препоследовательности или секреторного лидера функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде препротейна, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы облегчить трансляцию. Как правило, «функционально связанный» означает, что связываемые последовательности ДНК являются смежными, а в случае секреторного лидера - смежными и находятся в фазе считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными. Связывание осуществляют за счет лигирования в удобных сайтах рестрикции. Если таких сайтов не существует, в соответствии с общепринятой практикой используют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

В рамках настоящего изобретения выражения «клетка», «клетка-хозяин», «линия клеток» и «культура клеток» использованы взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают потомство.

«Лечить» или «лечение» означает введение средства, такого как композиция, содержащая любое из антител или их антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению, внутрь или наружно субъекту или пациенту, имеющему один или несколько симптомов заболевания или подозрение на заболевание, при котором средство обладает терапевтической активностью. Как правило, средство вводят в

количестве, эффективном для облегчения одного или нескольких симптомов заболевания у субъекта или популяции, получающих лечение, либо путем индуцирования регрессии, либо ингибирования, задержки или замедления прогрессирования такого симптома (симптомов) в любой клинически измеримой степени. Количество средства, которое является эффективным для облегчения любого конкретного симптома заболевания, может меняться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст и вес пациента, а также способность лекарственного средства вызывать желаемый ответ у субъекта. Облегчение симптома заболевания можно оценить с помощью любого клинического измерения, обычно используемого врачами или другими квалифицированными медицинскими работниками для оценки тяжести или состояния прогрессирования этого симптома. Этот термин также включает отсрочку развития симптомов, связанных с расстройством, и/или уменьшение тяжести симптомов такого расстройства. Термины также включают облегчение существующих неконтролируемых или нежелательных симптомов, предотвращение дополнительных симптомов и улучшение или предотвращение основных причин таких симптомов. Таким образом, эти термины означают, что положительный результат был достигнут у субъекта, относящегося к позвоночным с заболеванием, нарушением или симптомом, или с возможностью развития такого заболевания, нарушения или симптома.

Tau-pS413

Tau-белок, кодируемый геном MAPT, расположен на хромосоме 17 (17q21) в геноме человека. Tau-белок является одним из связывающих микротрубочки белков, в большом количестве экспрессируемых в центральной нервной системе. Было обнаружено, что тау-белок является основным составляющим белком в парных спиральных филаментах и прямых филаментах, образующих NFT при AD, одном из наиболее известных нейродегенеративных заболеваний, и его внутриклеточное накопление было продемонстрировано при различных нейropатологических состояниях. Заболевания, вызванные таким внутриклеточным накоплением тау, в совокупности называются «тауопатиями» (Tetsuaki Arai, «Shinkei Naika» (документ Японии), Vol.72, специальный номер, (Suppl.6), 2010, pp.46-51). Тауопатии включают нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), кортикобазальная дегенерация (CBD) или кортикобазальный синдром (CBS), прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Пика, деменция с агриофильной зернистостью (заболевание с агриофильной зернистостью), множественная системная таупатия с деменцией (MSTD), лобно-височная деменция и паркинсонизм, сцепленные с хромосомой 17 (FTDP-17), деменция с нейрофибриллярными клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцинозом (DNTC), таупатия белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI), лобно-височная долевая дегенерация с тау-положительными включениями (FTLD-tau). Тауопатиями также включают ненейродегенеративные заболевания, включая: инфекционные заболевания, такие как последствия энцефалита Экономо и подострый склерозирующий панэнцефалит; и вызванные травмой состояния, такие как

энцефалопатия боксеров (Tetsuaki Arai, «Shinkei Naika» (документ Японии), Vol.72, специальный номер, (Suppl.6), 2010, pp.46-51).

Было идентифицировано, что ген MAPP состоит из 13 экзонов, расположенных в геноме, которые могут экспрессироваться в виде нескольких различных изоформ белка посредством альтернативного сплайсинга (Tetsuaki Arai, «Shinkei Naika» (японский документ), Vol.72, специальный номер, (Suppl.6), 2010, с.46-51). Структура тау включает N-концевой кислый домен, содержащий 0-2 повторяющихся последовательности (N) из 29 аминокислот, зависящих от альтернативного сплайсинга экзона 2 и экзона 3 (N0-N2), промежуточный домен, богатый пролином, и C-концевой домен связывания микротрубочек (кодируется экзонами с 9 по 12), содержащий 3 (3R) или 4 (4R) повторяющихся последовательности (R), которые способствуют связыванию микротрубочек (Alistair Burns et al. (Edit.), *Dementia*, 3rd Edition, 2005, CRC Press, pp.408-464; Tetsuaki Arai, «Shinkei Naika» (документ Японии), Vol.72, специальный номер, (Suppl.6), 2010, pp.46-51). Следовательно, человеческий тау имеет шесть репрезентативных изоформ: 3R0N (352 аминокислоты), 3R1N (381 аминокислота), 3R2N (410 аминокислот), 4R0N (383 аминокислоты), 4R1N (412 аминокислот) и 4R2N (441 аминокислота) в зависимости от количество повторяющихся последовательностей из 29 аминокислот (N) и повторяющихся последовательностей, связывающих микротрубочки (R), которые он содержит. Чтобы однозначно определить положение аминокислотного остатка в любой из этих изоформ тау, номера аминокислот (от 1 до 441) самой длинной изоформы, то есть 4R2N (приведенной в SEQ ID NO:1), использованы в данном документе в качестве ссылки. Например, «Ser413» относится к остатку серина в 413 аминокислотном положении в 4R2N (приведенной в SEQ ID NO:1), который соответствует серину в 384 аминокислотном положении в 4R1N (приведенной в SEQ ID NO:2), 355 аминокислотное положение в 4R0N (приведенной в SEQ ID NO:3), 382 аминокислотное положение в 3R2N (приведенной в SEQ ID NO:4), 353 аминокислотное положение в 3R1N (приведенной в SEQ ID NO: 5) и 324 аминокислотное положение в 3R0N (приведенной в SEQ ID NO:6).

Кроме того, тау, накапливающийся при нейродегенеративных заболеваниях, характеризуется высокой степенью модификации посредством фосфорилирования. У пациентов с легкими когнитивными нарушениями наблюдается корреляция между уровнем фосфорилированного тау в спинномозговой жидкости и степенью атрофии гипофиза, что позволяет предположить, что фосфорилированный тау является высоконадежным биомаркером нейродегенерации у пациентов с тауопатией (Wendy Noble et al., *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2011, Vol.6, No.8, pp.797-810). Однако существует большое количество сайтов, которые могут быть фосфорилированы в тау, в то время как практически отсутствует информация о том, какие антитела и сайты фосфорилирования эффективны для лечения таупатии.

Кроме того, при использовании антитела в качестве активного соединения для терапевтического или профилактического средства, необходимо учитывать количество антител, вводимых пациентам, чтобы избежать побочных эффектов и свести к минимуму

такие проблемы, как иммуногенность, производственные мощности и медицинские расходы. Это особенно важно в отношении доз при хронических заболеваниях или генетических заболеваниях. Кроме того, хотя головной мозг является органом-мишенью для лечения когнитивных расстройств, таких как AD, обычно считается, что системное введение внутривенным или подкожным путем приводит к низкой скорости миграции антител из крови в мозг из-за присутствия гематоэнцефалического барьера. Соответственно, существует серьезная проблема, связанная с тем, что антитела, используемые для лечения когнитивных расстройств, требуют высоких доз по сравнению с лечением заболеваний, затрагивающих другие органы. Таким образом, на фоне этих проблем особенно неожиданно и удивительно для авторов изобретения получить высокоаффинные антитела против тау-pS413, которые могут достигать достаточных терапевтических эффектов, не затрагивая непатологический тау-белок или требуя введения в очень высоких дозах.

Высокоаффинные антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты

Предыдущие описания антител против тау-pS413 включают WO 2013/180238 и WO 2018/254390, полное описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В отличие от предшествующих описаний, настоящее изобретение относится к антителам против тау-pS413 с более высокой аффинностью (например к различным изотипам V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM). AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающим фрагментам. Эти высокоаффинные антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты проявляют повышенную активность связывания по сравнению с ранее описанными антителами против тау-pS413 (например по меньшей мере в 10-40 раз больше) с образцами рекомбинантного белка или пептида тау-pS413, головного мозга трансгенных мышей тау, гомогенатов головного мозга пациентов с AD и CSF пациентов с AD. Такие высокоаффинные антитела (например различные изотипы V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающие фрагменты также могут эффективно предотвращать развитие тау-патологии в нейронах hu-iPSC, индуцированной при посеве гомогенатов головного мозга при AD.

В данном раскрытии оптимизированные (например с более высокой аффинностью) варианты ранее раскрытых антител против тау-pS413 были получены путем созревания аффинности для повышения эффективности или структурного моделирования для идентификации одной или нескольких аминокислотных мутаций (например K54E или K54D), которая снижает pI (изоэлектрическую точку), улучшает аффинность и увеличивает выработку молекул антитела. В некоторых вариантах осуществления оптимизированные (например с более высокой аффинностью) антитела против тау-pS413 могут быть получены путем созревания аффинности. В некоторых вариантах осуществления оптимизированные (например с более высокой аффинностью) антитела против тау-pS413 могут быть получены путем моделирования на основе структуры для

выявления одной или нескольких аминокислотных мутаций (например K54E или K54D), которые снижают pI, улучшают аффинность и увеличивают образование молекул антител. В других вариантах осуществления оптимизированные (например с более высокой аффинностью) антитела против тау-pS413 могут быть получены путем созревания аффинности и структурного моделирования для выявления одной или нескольких аминокислотных мутаций (например K54E или K54D), которые снижают pI, улучшают аффинность и увеличивают выработку молекул антитела. В дополнительных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи оптимизированных (например с более высокой аффинностью) антител против тау-pS413 переключается с изотипа IgG4-S228P на IgG1-LALA для улучшения коллоидной стабильности и снижения вязкости при сохранении сниженной эффекторной функции Fc. В дополнительных вариантах осуществления мутация YTE, удлиняющая время полужизни, интегрирована в Fc-область для увеличения времени полужизни оптимизированных (например с более высокой аффинностью) антител против тау-pS413. В других вариантах осуществления константная область тяжелой цепи оптимизированных (например с более высокой аффинностью) антител против тау-pS413 переключается с изотипа IgG4-S228P на IgG1-LALA, и мутация YTE, удлиняющая время полужизни, интегрируется в Fc-область. В предпочтительном варианте осуществления оптимизированные (например с более высокой аффинностью) антитела против тау-pS413 (например V1-AFM-hIgG1-LALA-YTE, V2-AFM-hIgG1-LALA-YTE, V3-AFM-hIgG1-LALA-YTE, YTE, V4-AFM-hIgG1-LALA-YTE, V5-AFM-hIgG1-LALA-YTE, V6-AFM-hIgG1-LALA-YTE, V7-AFM-hIgG1-LALA-YTE или V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE) получают путем 1) созревания аффинности, 2) структурного моделирования для выявления мутации (например K54E или K54D), которая снижает pI, улучшает аффинность и увеличивает выработку молекул антител, 3) переключения изотипа на IgG1-LALA для улучшения коллоидной стабильности и снижения вязкости при сохранении сниженной эффекторной функции Fc и 4) интеграции мутации YTE в Fc-область для увеличения времени полужизни.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и VL-CDR1, содержащую

В одном варианте осуществления анти тело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52; и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации IMGT. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Contact.

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40.

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации IMGT. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Contact.

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24; и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации IMGT. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Chothia. В других

вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Contact.

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24; и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации IMGT. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют системе нумерации Contact.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:44, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:32.

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:44, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36.

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:44, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:40.

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:44, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:28.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:44, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:20.

[illegible]

[illegible]

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоит из двух легких цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:71, и двух тяжелых цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:72. В определенных вариантах осуществления имеется остаток лизина на С-конце константной области тяжелой цепи. В других вариантах осуществления остаток лизина на С-конце константной области тяжелой цепи отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоит из двух легких цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:73, и двух тяжелых цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:74. В определенных вариантах осуществления имеется остаток лизина на С-конце константной области тяжелой цепи. В других вариантах осуществления остаток лизина на С-конце константной области тяжелой цепи отсутствует.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоит из двух легких цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:75, и двух тяжелых цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:76. В определенных вариантах осуществления имеется остаток лизина на С-конце константной области тяжелой цепи. В других вариантах осуществления остаток лизина на С-конце константной области тяжелой цепи отсутствует.

В различных вариантах осуществления антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 1×10^{-8} М или менее, 9×10^{-9} М или менее, 8×10^{-9} М или менее, 7×10^{-9} М или менее, 6×10^{-9} М или менее, 5×10^{-9} М или менее, 4×10^{-9} М или менее, 3×10^{-9} М или менее или 2×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 1×10^{-8} М или менее для тау-pS413. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 9×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 8×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 7×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 6×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 5×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 4×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В других

вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 3×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет равновесную константу диссоциации (KD) 2×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В некоторых вариантах осуществления KD измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В определенных вариантах осуществления KD измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с иммобилизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В других вариантах осуществления KD измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с иммобилизованным антигеном. В одном варианте осуществления KD измеряют с помощью Biacore. В другом варианте осуществления KD измеряют с помощью KinExA. В одном отдельном варианте осуществления KD измеряют с помощью Biacore с иммобилизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54; VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35; и имеет KD 1×10^{-8} М или менее для тау-pS413. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54; VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35; и имеет KD 9×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54; VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35; и имеет KD 8×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53; VH-CDR2,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54; VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35; и имеет KD 2×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В частном варианте осуществления KD измеряют с помощью Вiascore с иммобилизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56 и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; и имеет KD 1×10^{-8} М или менее для тау-pS413. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56 и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; и имеет KD 9×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56 и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; и имеет KD 8×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56 и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; и имеет KD 7×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56 и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; и имеет KD 6×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56 и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; и имеет KD 5×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56 и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; и имеет KD 4×10^{-9} М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56 и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; и имеет $KD 3 \times 10^{-9}$ М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56 и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; и имеет $KD 2 \times 10^{-9}$ М или менее для тау-pS413. В частном варианте осуществления KD измеряют с помощью Biacore с иммобилизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:56, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36; и имеет $KD 1 \times 10^{-8}$ М или менее для тау-pS413. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:56, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36; и имеет $KD 9 \times 10^{-9}$ М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:56, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36; и имеет $KD 8 \times 10^{-9}$ М или менее для тау-pS413. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:56, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36; и имеет $KD 7 \times 10^{-9}$ М или менее для тау-pS413. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:56, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36; и имеет $KD 6 \times 10^{-9}$ М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности

по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:56, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36; и имеет $KD 5 \times 10^{-9}$ М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:56, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36; и имеет $KD 4 \times 10^{-9}$ М или менее для тау-pS413. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:56, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36; и имеет $KD 3 \times 10^{-9}$ М или менее для тау-pS413. В дополнительных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-pS413, содержит VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:56, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36; и имеет $KD 2 \times 10^{-9}$ М или менее для тау-pS413. В частном варианте осуществления KD измеряют с помощью Biotac с иммобилизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Настоящее раскрытие дополнительно включает функциональные фрагменты антител против тау-pS413, раскрытые в данном документе. Неограничивающие примеры функциональных фрагментов (например антигенсвязывающих фрагментов, например фрагментов связывания тау-pS413) включают одноцепочечные Fv (scFv) (например включая моноспецифические, биспецифические и так далее), Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, F(ab)₂-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fv с дисульфидной связью (dsFv), Fd-фрагменты, Fv-фрагменты, диатело, триатело, тетратело и минитело. В частности, антитела, представленные в данном документе, включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, например, антигенсвязывающие домены или молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном тау-pS413 (например одну или несколько CDR антитела против тау-pS413). Такие фрагменты антитела можно найти, например, в Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1989); Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers ed., 1995); Huston et al., 1993, *Cell Biophysics* 22:189-224; Pluckthun and Skerra, 1989, *Meth. Enzymol.* 178:497-515; Day, *Advanced Immunochemistry* (2d ed. 1990); Hudson et al., 2003, *Nature Med.* 9:129-34.

Иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам в зависимости от аминокислотных последовательностей константного домена их тяжелых цепей.

Существует по меньшей мере пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и несколько из них можно дополнительно подразделить на подклассы (изотипы), например IgG-1, IgG-2, IgG-3 и IgG-4; IgA-1 и IgA-2. Изобретение содержит антитела и антигенсвязывающие фрагменты любого из этих классов или подклассов антител.

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи, например константную область человека, такую как константная область тяжелой цепи человека $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ или $\gamma 4$ или ее вариант. В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область легкой цепи, например константную область легкой цепи человека, такую как область легкой цепи лямбда или каппа человека или ее вариант.

Конструирование Fc-области антитела

Антитела, раскрытые в данном документе, также можно сконструировать таким образом, чтобы они содержали модификации в Fc-области, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание с рецептором Fc и/или эффекторная функция (например антигензависимая клеточная цитотоксичность). Кроме того, антитела, раскрытые в данном документе, можно химически модифицировать (например можно присоединить к антителу один или несколько химических фрагментов) или модифицировать для изменения его гликозилирования, опять же для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления описан более подробно ниже. Нумерация остатков в Fc-области соответствует индексу ЕС Kabat.

Антитела, раскрытые в данном документе, также включают антитела с модифицированными (или блокированными) Fc-областями для обеспечения измененных эффекторных функций. См., например, патент США № 5624821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702. Такую модификацию можно использовать для усиления или подавления различных реакций иммунной системы с возможными благоприятными эффектами в диагностике и терапии. Изменения Fc-области включают изменения аминокислот (замены, делеции и вставки), гликозилирование или дегликозилирование и добавление нескольких Fc. Изменения в Fc также могут изменить время полужизни терапевтических антител, что позволит реже вводить дозы и, таким образом, повысить удобство и сократить использование материала. См. Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 at 734-35.

В одном варианте осуществления константный домен (CH1-шарнир-CH2-CH3) человеческого IgG1 дикого типа модифицирован двумя аминокислотными заменами, L234A и L235A (иногда называемыми мутациями «LALA»), которые снижают/устраняют эффекторную функцию. В другом варианте осуществления константный домен (CH1-шарнир-CH2-CH3) человеческого IgG1 дикого типа модифицирован тремя аминокислотными заменами, L234A, L235A и D265S, которые снижают/устраняют

эффекторную функцию. В еще одном варианте осуществления константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG1 дикого типа модифицирован тремя аминокислотными заменами, M252Y, S254T и T256E, которые увеличивают время полужизни антитела в сыворотке. В еще одном варианте осуществления константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG1 дикого типа модифицирован пятью аминокислотными заменами, L234A, L235A, M252Y, S254T и T256E, которые снижают/устраняют эффекторную функцию и увеличивают время полужизни антитела в сыворотке. В еще одном варианте осуществления константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG1 дикого типа модифицирован шестью аминокислотными заменами, L234A, L235A, D265S, M252Y, S254T и T256E, которые снижают/устраняют эффекторную функцию и увеличивают время полужизни антитела в сыворотке. В другом варианте осуществления константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG1 дикого типа модифицирован аминокислотной заменой N297A, которая устраняет сайт гликозилирования и снижает/устраняет эффекторную функцию. В еще одном варианте осуществления константный домен (СН1-шарнир-СН2-СН3) человеческого IgG1 дикого типа модифицирован аминокислотной заменой N297Q, которая устраняет сайт гликозилирования и снижает/устраняет эффекторную функцию.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgG4, содержащее мутацию серина в пролин в аминокислотном положении, соответствующем положению 228 (S228P; индекс ЕС) в шарнирной области константной области тяжелой цепи. Сообщалось, что эта мутация устраняет гетерогенность дисульфидных мостиков между тяжелыми цепями в шарнирной области (Angal et al., выше; положение 241 основано на системе нумерации Kabat).

В одном варианте осуществления шарнирная область СН1 модифицирована таким образом, что количество цистеиновых остатков в шарнирной области увеличивается или уменьшается. Этот подход дополнительно описан в патенте США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирной области СН1 изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления антитело модифицируют для увеличения его биологического времени полужизни. Возможны различные подходы. Например, можно ввести одну или несколько следующих аминокислотных мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375. В качестве альтернативы, для увеличения биологического времени полужизни антитело можно изменить в области СН1 или СL так, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора реутилизации, взятый из двух петель домена СН2 Fc-области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022.

В других вариантах осуществления Fc-область изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторной функции (функций) антитела. Например, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков в положениях 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, можно заменить другим аминокислотным остатком, чтобы антитело

имело измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменена, может представлять собой, например, Fc-рецептор или C1-компонент комплемента. Этот подход более подробно описан в патентах США № 5624821 и 5648260.

В другом примере одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков в положениях 329, 331 и 322, могут быть заменены другим аминокислотным остатком, так что у антитела изменяется связывание C1q и/или снижается или устраняется комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Этот подход более подробно описан в патенте США № 6194551.

В другом примере изменяют один или несколько аминокислотных остатков в аминокислотных положениях 231 и 239, тем самым изменяя способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход дополнительно описан в публикации PCT WO 94/29351.

В еще одном примере Fc-область модифицируют для увеличения или уменьшения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения или уменьшения аффинности антитела к рецептору Fcγ путем модификации одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 238, 239, 243, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Этот подход описан далее в Публикации PCT WO 00/42072. Более того, были картированы сайты связывания на IgG1 человека для FcγR1, FcγRII, FcγRIII и FcRn, и описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Было показано, что специфические мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII. Кроме того, было показано, что следующие комбинированные мутанты улучшают связывание FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A.

В одном варианте осуществления Fc-область модифицируют для снижения способности антитела опосредовать эффекторную функцию и/или усиления противовоспалительных свойств путем модификации аминокислотных остатков в положениях 243 и 264. В одном варианте осуществления Fc-область антитела модифицируют путем замены аминокислотных остатков в положениях 243 и 264 на аланин. В одном варианте осуществления Fc-область модифицируют для снижения способности антитела опосредовать эффекторную функцию и/или для усиления противовоспалительных свойств путем модификации аминокислотных остатков в положениях 243, 264, 267 и 328.

В еще одном варианте осуществления антитело имеет определенный тип гликозилирования. Например, может быть получено агликозилированное антитело (то

есть антитело не имеет гликозилирования). Профиль гликозилирования антитела можно изменить, например, для увеличения аффинности или авидности антитела к антигену. Такие модификации могут быть выполнены, например, путем изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно произвести одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к удалению одного или нескольких сайтов гликозилирования каркаса вариабельной области, тем самым устраняя гликозилирование в этом сайте. Такое агликозилирование может повысить аффинность или авидность антитела к антигену. См., например, патенты США № 5714350 и 6350861.

Также может быть получено антитело, в котором профиль гликозилирования включает гипофукозилированные или афукозилированные гликаны, такие как гипофукозилированные антитела или афукозилированные антитела, имеющие уменьшенное количество фукозильных остатков в гликане. Антитело может также содержать гликаны, имеющие повышенное количество структур с GlcNac в точках ветвления. Было продемонстрировано, что такие измененные профили гликозилирования увеличивают способность антител к ADCC. Такие модификации могут быть осуществлены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине, в которой путь гликозилирования был генетически сконструирован для получения гликопротеинов с определенными профилями гликозилирования. Эти клетки были описаны в данной области и могут быть использованы в качестве клеток-хозяев, в которых можно экспрессировать рекомбинантные антитела согласно изобретению, чтобы таким образом получить антитело с измененным гликозилированием. Например, в клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 (α (1,6)-фукозилтрансфераза), так что антитела, экспрессируемые в клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709, не содержат фукозы на своих углеводах. Клеточные линии Ms704, Ms705 и Ms709 FUT8^{-/-} были созданы путем целенаправленного разрушения гена FUT8 в клетках CHO/DG44 с использованием двух замещающих векторов (см. публикацию патента США № 20040110704 и Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). В качестве другого примера в EP 1176195 описана клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, так что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, демонстрируют гипофукозилирование за счет снижения или устранения фермента, связанного связью α -1,6. В EP 1176195 также описаны клеточные линии с низкой ферментативной активностью для добавления фукозы к N-ацетилглюкозамину, который связывается с Fc-областью антитела или не обладает ферментативной активностью, например клеточная линия крысиной миеломы YB2/0 (ATCC CRL 1662). В публикации PCT WO 03/035835 описан вариант линии клеток CHO, клеток Lec13 со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также Shields et al. (см. также Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Антитела с модифицированным профилем гликозилирования также

могут быть получены в куриных яйцах, как описано в публикации PCT WO 06/089231. Альтернативно, антитела с модифицированным профилем гликозилирования могут быть получены в растительных клетках, таких как *Lemna* (патент США 7632983). Способы получения антител в растительной системе раскрыты в патентах США 6998267 и 7388081. В публикации PCT WO 99/54342 описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии модифицирующих гликопротеин гликозилтрансфераз (например $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), так что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, демонстрируют увеличенные структуры с GlcNac в точках ветвления, что приводит к повышенной активности ADCC антител (см. также Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* **17**:176-180).

Альтернативно остатки фукозы антитела могут быть отщеплены с использованием фермента фукозидазы; например α -L-фукозидаза удаляет фукозильные остатки из антител (Tarentino et al. (1975) *Biochem.* **14**:5516-23).

Антитела, описанные в настоящем документе, дополнительно включают антитела, продуцируемые в клетках-хозяевах низших эукариот, в частности в клетках-хозяевах грибов, таких как дрожжи и мицелиальные грибы, которые были генетически сконструированы для продуцирования гликопротеинов, которые имеют профили гликозилирования, подобные млекопитающим или человеку (см., например, Choi et al., (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.* **100**:5022-5027, Hamilton et al., (2003) *Science* **301**:1244-1246, Hamilton et al., (2006) *Science* **313**:1441-1443). Особым преимуществом этих генетически модифицированных клеток-хозяев по сравнению с используемыми в настоящее время клеточными линиями млекопитающих является способность регулировать профиль гликозилирования гликопротеинов, которые продуцируются в клетках, так что можно продуцировать композиции гликопротеинов, в которых преобладает конкретная структура N-гликанов (см., например, патент США № 7029872 и патент США № 7449308). Эти генетически модифицированные клетки-хозяева использованы для получения антител, которые имеют преимущественно определенные структуры N-гликанов (см., например, Li et al., (2006) *Nat. Biotechnol.* **24**: 210-215).

Конъюгаты антител

Антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем документе, также могут быть конъюгированы с одним или несколькими средствами (например пептидом или химическим фрагментом). Химический фрагмент может быть без ограничения полимером, радионуклидом или терапевтическим или профилактическим средством. В конкретных вариантах осуществления химическая фрагмент представляет собой полимер, который увеличивает время полужизни молекулы антитела в организме субъекта. Подходящие полимеры включают без ограничения гидрофильные полимеры, которые включают без ограничения полиэтиленгликоль (PEG) (например PEG с молекулярной массой 2 кДа, 5 кДа, 10 кДа, 12 кДа, 20 кДа, 30 кДа или 40 кДа), декстран и метоксиполиэтиленгликоль (mPEG). У Lee, et al., (1999) (*Bioconj. Chem.* **10**:973-981) раскрыты конъюгированные с PEG одноцепочечные антитела. У Wen,

et al., (2001) (Bioconj. Chem. 12:545-553) раскрыта конъюгация антител с PEG, который присоединен к хелатору радиоактивного металла (диэтилентриаминпентауксусной кислоте (DTPA)).

Антитела и фрагменты антител, описанные в настоящем документе, могут быть пегилированы, например, для увеличения их биологического времени полужизни (например в сыворотке). Для пегилирования антитела антитело или его фрагмент обычно подвергают взаимодействию с реакционноспособной формой полиэтиленгликоля (PEG), такой как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное PEG, в условиях, в которых одна или несколько групп PEG присоединяются к антителу или фрагменту антитела. В конкретных вариантах осуществления пегилирование проводят посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой PEG (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). В рамках настоящего изобретения термин «полиэтиленгликоль» предназначен для охвата любой из форм PEG, которые использовали для получения производных других белков, таких как моно (C1-C10) алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В некоторых вариантах осуществления пегилируемое антитело представляет собой агликозилированное антитело. Способы пегилирования белков известны в данной области и могут быть применены к антителам согласно изобретению. См., например, EP 0154316 и EP 0401384.

Антитела и фрагменты антител, описанные в настоящем документе, также могут быть конъюгированы с поддающимися обнаружению веществами, включая без ограничения различные ферменты, такие как без ограничения пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как без ограничения стрептавидин/биотин или авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как без ограничения умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как без ограничения люминол; биолюминесцентные материалы, такие как без ограничения люцифераза, люциферин или экворин; хемилюминесцентный материал, такой как без ограничения соединение на основе акридиния или HALOTAG; радиоактивные материалы, такие как без ограничения йод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I и ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In и ^{111}In), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), галлий (^{68}Ga и ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn или ^{117}Sn ; позитронно-активные металлы с использованием различных позитронно-эмиссионных томографов; и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов.

В других вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть рекомбинантно слиты или химически конъюгированы (ковалентные или нековалентные конъюгации) с гетерологичным белком или полипептидом (или его фрагментом, например с полипептидом примерно 10, примерно

20, примерно 30, примерно 40, примерно 50, примерно 60, примерно 70, примерно 80, примерно 90 или примерно 100 аминокислот) для получения слитых белков. В частности, в настоящем документе представлены слитые белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент антитела, представленного в настоящем документе (например Fab-фрагмент, Fc-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab)₂-фрагмент, домен VH, CDR VH, домен VL, или CDR VL) и гетерологичный белок, полипептид или пептид. В одном варианте осуществления гетерологичный белок, полипептид или пептид, с которым слито антитело, можно использовать для нацеливания антитела на конкретный тип клеток, например на нейронную клетку. Например, антитело, которое связывается с рецептором клеточной поверхности, экспрессируемым конкретным типом нейронных клеток, может быть слито или конъюгировано с модифицированным антителом, представленным в настоящем документе.

Можно использовать любой известный в данной области метод конъюгации молекул антител с различными фрагментами, включая способы, описанные Hunter, et al., (1962) *Nature* 144:945; David, et al., (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain, et al., (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; and Nygren, J., (1982) *Histochem. and Cytochem.* 30:407.

Способы применения высокоаффинных антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающих фрагментов

Настоящее раскрытие также включает способы применения высокоаффинных антител против тау-pS413 (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе. Эти антитела можно использовать для лечения, диагностики или мониторинга прогрессирования таупатии или уменьшения количества тау-pS413 в головном мозге субъекта с таупатией.

В одном аспекте представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе.

В еще одном аспекте представлен способ уменьшения количества тау-pS413 в головном мозге субъекта с таупатией, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов описанных в данном документе.

В дополнительных вариантах осуществления представлено применение антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, для лечения таупатии у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления представлено применение антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном

документе, для снижения количества тау-pS413 в головном мозге субъекта с таупатией.

В дополнительных вариантах осуществления представлено применение антител (например различных изоформ V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, для лечения таупатии у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления представлено применение антител (например различных изоформ V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, для получения лекарственного средства для лечения таупатии у субъекта.

В дополнительном варианте осуществления представлены антитела (например различные изоформы V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, для применения в способе лечения таупатии у субъекта.

В еще одном варианте осуществления представлены антитела (например различные изоформы V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, для применения в способе уменьшения количества тау-pS413 в головном мозге субъекта с таупатией.

В одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат: VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

В одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат: VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

В одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат: VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41;

В одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91.

В еще одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат: VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:100; и VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:96; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97.

В одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат: VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:106; и VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103.

В другом варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат: VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44; и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

В одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат: VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44; и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36.

В одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат: VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44; и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40.

В одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта,

В одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты

В еще одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у

субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат: легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74.

В еще одном варианте осуществления представлен способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антител или их антигенсвязывающих фрагментов, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат: легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту дополнительного средства.

В отдельных вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, эффективное для лечения того же или другого заболевания, для лечения которого используют антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, эффективное для смягчения одного или нескольких побочных эффектов антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. Иллюстративные дополнительные средства включают без ограничения: ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты рецепторов HMDA (такие как мемантин), ингибиторы агрегации бета-амилоидных пептидов, антиоксиданты, модуляторы гамма-секретазы, имитаторы фактора роста нервов (NGF) или генную терапию NGF, агонисты PPAR γ , ингибиторы HMS-CoA-редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецепторов GABA, ингибиторы киназы гликогенсинтазы, внутривенный иммуноглобулин, агонисты мускариновых рецепторов, модуляторы никотиновых рецепторов, активный или пассивный бета-амилоидный пептид для иммунизации, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты серотониновых рецепторов, антитела против бета-амилоидного пептида, гормон роста, нейротрофический фактор, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-4/5, фактор роста фибробластов (FGF)-2 и другие FGF, нейротрофин (NT)-3, эритропоэтин (EPO), фактор роста гепатоцитов (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF)- α 1, TGF-бета, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейтурин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), херегулин, нейрегулин, артемин, персефин, интерлейкины, нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GFR), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (CSF), гранулоцитарно-макрофагальный CSF, нетрины, кардиотрофин-1, белки hedgehog, фактор ингибирования лейкемии (LIF), мидкин, плейотрофин, костные морфогенетические белки (BMP), нетрины, сапозины, семафорины, фактор стволовых клеток (SCF) или другое антитело против тау.

Такая комбинированная терапия, упомянутая выше, включает комбинированное введение (где два или более средства включены в один и тот же или отдельные препараты) и раздельное введение, и в этом случае введение антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающих фрагментов может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного средства и/или адъюванта. Антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, также можно использовать в сочетании с другими интервенционными методами лечения, такими как без ограничения лучевая терапия, поведенческая терапия или другие методы лечения, известные в данной области и подходящие для неврологического расстройства, подлежащего лечению или профилактике, например подходы регенеративной медицины, в которых используются биотехнологии, включая генную терапию, генно-модифицированную клеточную терапию, клеточную терапию и тканевую инженерию для восстановления или установления нормальной функции мозга.

Антитела против тау-pS413 или их фрагменты также могут быть полезны в диагностических анализах на тау-pS413, например, для обнаружения его присутствия в определенных нейронных клетках, тканях головного мозга, CSF или интерстициальной жидкости (ISF). Такие диагностические способы могут быть полезны при диагностике различных заболеваний или при наблюдении за развитием заболевания.

Например, конкретные варианты осуществления включают анализы ELISA, включающие использование описанных в данном документе антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающих фрагментов.

Иллюстративный способ включает следующие этапы:

- (a) нанесение на подложку (например поверхность лунки титрационного микропланшета, например, пластиковую пластину) первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;
- (b) нанесение на подложку образца для проверки на наличие тау-pS413;
- (c) промывка планшета, чтобы удалить несвязанный материал в образце;
- (d) нанесение поддающегося обнаружению меченого второго антитела (например антитела, связанного с ферментом);
- (e) промывка субстрата, чтобы удалить несвязавшееся меченое второе антитело;
- (f) если меченое второе антитело связано с ферментом, нанесение химического вещества, которое преобразуется ферментом во флуоресцентный сигнал; и
- (g) обнаружение присутствия меченого второго антитела.

В приведенном выше иллюстративном способе антитела против тау-pS413, описанные в настоящем документе, могут представлять собой первое антитело или второе антитело, или как первое, так и второе антитела. В одном варианте осуществления антитело против тау-pS413, описанное в настоящем документе, представляет собой первое антитело, а второе антитело представляет собой другое антитело, специфичное к тау-белку или фосфорилированному тау-белку. В другом варианте осуществления антитело против тау-pS413, описанное в настоящем документе, представляет собой второе

антитело, а первое антитело представляет собой другое антитело, специфичное к тау-белку или фосфорилированному тау-белку.

В другом варианте осуществления меченое антитело против тау-pS413 метят пероксидазой, которая реагирует с ABTS (например 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислотой)) или 3,3', 5,5'-тетраметилбензидином для изменения окраски, которое можно обнаружить. Альтернативно, меченое антитело против тау-pS413 метят поддающимся обнаружению радиоизотопом (например ^3H), который можно обнаружить с помощью сцинтилляционного счетчика в присутствии сцинтиллятора.

Описанное в данном документе антитело против тау-pS413 можно использовать в процедуре вестерн-блоттинга или иммунно-белкового блоттинга.

Иллюстративный способ включает следующие этапы:

(1) контактирование мембраны или другого твердого субстрата, подлежащего тестированию на наличие тау-pS413 или его фрагмента, с антителом против тау-pS413 или его фрагментом, описанным в настоящем документе;

(2) промывание мембраны один или несколько раз для удаления несвязанного антитела против тау-pS413 или его фрагмента и других несвязанных веществ; и

(3) обнаружение связанного антитела против тау-pS413 или его фрагмента.

Такая мембрана может иметь вид мембраны на основе нитроцеллюлозы или винила (например поливинилиденфторида (PVDF)), на которую были перенесены (например после электрофоретического разделения в геле) белки, подлежащие тестированию на наличие тау-pS413 в неденатурирующем геле PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле) или геле SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия). Перед контактом мембраны с антителом или фрагментом против тау-pS413 мембрану необязательно блокируют, например, обезжиренным сухим молоком и тому подобное, чтобы блокировать неспецифические сайты связывания белка на мембране.

Обнаружение связанного антитела или фрагмента может быть осуществлено путем связывания антитела или фрагмента с меченым с возможностью обнаружения вторичным антителом (антителом против иммуноглобулина), а затем путем определения присутствия вторичного антитела.

Антитела против тау-pS413 и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем документе, также могут быть использованы для иммуногистохимии. Такой способ является частью настоящего описания и включает, например, (1) приведение в контакт клетки или ткани, подлежащих тестированию на наличие тау-pS413, с антителом против тау-pS413 или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем документе; и (2) обнаружение антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающих фрагментов на клетке или в клетке или ткани. Если само антитело против тау-pS413 или его фрагмент метят поддающейся обнаружению меткой, их можно детектировать напрямую. Альтернативно, антитело против тау-pS413 или его фрагмент могут связываться со детектируемым вторичным антителом, меченым с возможностью обнаружения.

Антитела против тау-pS413 и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, также можно использовать для визуализации *in vivo*. Такой способ может включать инъекцию меченых радиоактивным изотопом антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающего фрагмента в организм пациента для тестирования на наличие таупатии, связанной с присутствием тау-pS413, с последующей радионуклидной визуализацией организма пациента для обнаружения присутствия меченого антитела против тау-pS413 или его фрагмента, например, в локусах, содержащих высокую концентрацию антител против тау-pS413 или их фрагментов, которые связаны с тау-pS413 в головном мозге.

Методы визуализации включают визуализацию SPECT (однофотонная эмиссионная компьютерная томография) или визуализацию PET (позитронно-эмиссионная томография). Метки включают, например, йод-123 (^{123}I) и технеций-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), например, в сочетании с визуализацией SPECT или ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O или ^{18}F , например, в сочетании с визуализацией PET или индий-111 (см., например, Gordon et al., (2005) *International Rev. Neurobiol.* 67:385-440).

Таким образом, в дополнительных вариантах осуществления представлено применение антител (например различных изоформ V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, для диагностики таупатии у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления представлено применение антител (например различных изоформ V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, для отслеживания прогрессирования таупатии у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления представлено применение антител (например различных изоформ V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, для диагностики таупатии у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления представлено применение антител (например различных изоформ V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, для отслеживания прогрессирования таупатии у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления представлены антитела (например различные изоформы V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, для применения в способе диагностики таупатии у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления представлены антитела (например различные изоформы V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, для применения в способе мониторинга прогрессирования таупатии у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способ диагностики таупатии у субъекта

включает введение субъекту эффективного количества антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе; и визуализацию головного мозга субъекта.

В других вариантах осуществления способ диагностики таупатии у субъекта включает получение образца CSF или ISF у субъекта; проведение иммунодиагностического анализа (например ELISA) с антителами (например с различными изотипами V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или с их антигенсвязывающими фрагментами, описанными в данном документе; и определение наличия у субъекта таупатии.

В определенных вариантах осуществления способ мониторинга прогрессирования таупатии у субъекта включает введение субъекту эффективного количества антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе; и визуализацию головного мозга субъекта.

В других вариантах осуществления способ мониторинга прогрессирования таупатии у субъекта включает получение образца CSF или ISF у субъекта; проведение иммунодиагностического анализа (например ELISA) с антителами (например с различными изотипами V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или с их антигенсвязывающими фрагментами, описанными в данном документе; и определение прогрессирования таупатии у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления различных способов и вариантов применения, описанных в данном документе, таупатия представляет собой нейродегенеративное заболевание, включая без ограничения такие заболевания, как болезнь Альцгеймера (AD), кортикобазальная дегенерация (CBD) или кортикобазальный синдром (CBS), прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Пика, деменция с агриофильной зернистостью (заболевание с агриофильной зернистостью), множественная системная таупатия с пресенильной деменцией (MSTD), лобно-височная деменция и паркинсонизм, сцепленные с хромосомой 17 (FTDP-17), деменция с нейрофибриллярными клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцинозом (DNTC), таупатия белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI) или лобно-височная долевая дегенерация с патологией тау (FTLD-тау). В одном варианте осуществления таупатия представляет собой AD. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой CBD. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой болезнь Пика. В одном варианте осуществления таупатия представляет собой деменцию с агриофильной зернистостью. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой MSTD. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой FTDP-17. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой деменцию с нейрофибриллярными клубками.

В одном варианте осуществления таупатия представляет собой DNTC. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой WMT-GGI. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой FTLD-тау.

В других вариантах осуществления различных способов и вариантов применения, описанных в данном документе, таупатия представляет собой ненейродегенеративное заболевание, включая без ограничения инфекционные заболевания, такие как последствия энцефалита Экономо и подострый склерозирующий панэнцефалит и вызванные травмой состояния, такие как энцефалопатия боксеров. В одном варианте осуществления таупатия представляет собой последствия энцефалита Экономо. В другом варианте осуществления таупатия представляет собой подострый склерозирующий панэнцефалит. В еще одном варианте осуществления таупатия представляет собой энцефалопатию боксеров.

Нуклеиновые Кислоты, Векторы экспрессии, Клетки и Способы получения Антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающих фрагментов

Также в данном документе представлены выделенные нуклеиновые кислоты и векторы, содержащие полинуклеотидные последовательности, кодирующие такие высокоаффинные антитела (например различные изотипы V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM), раскрытые в данном документе, или их антигенсвязывающие фрагменты, клетки (например клетки-хозяева), содержащие такие выделенные нуклеиновые кислоты или векторы, и способы получения таких высокоаффинных антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов.

В одном аспекте представлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая различные полипептиды, раскрытые в данном документе.

В определенных вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует VH (например SEQ ID NO:44, 48, 52, 56 или 24) различных антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует VL (например SEQ ID NO:32, 36, 40, 28 или 20) различных антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. В других вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует VH (например SEQ ID NO:44, 48, 52, 56 или 24) и VL (например SEQ ID NO:32, 36, 40, 28 или 20) различных антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе.

В определенных вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь (например SEQ ID NO:72, 74 или 76) различных антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM,

V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь (например SEQ ID NO:71, 73 или 75) различных антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. В других вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь (например SEQ ID NO:72, 74 или 76) и легкую цепь (например SEQ ID NO:71, 73 или 75) различных антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе.

В одном варианте осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует домен VH, содержащий VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3, раскрытые в таблице 5.

В другом варианте осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует домен VL, содержащий VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, раскрытые в таблице 6.

В еще одном варианте осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует домен VH, содержащий VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3, раскрытые в таблице 5, и домен VL, содержащий VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, раскрытые в таблице 6.

В частном варианте осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:107. В другом частном варианте осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:108.

В еще одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты дополнительно кодируют сигнальную последовательность.

В другом аспекте представлен вектор экспрессии, содержащий одну или несколько различных выделенных нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе, где нуклеиновая кислота (кислоты) функционально связана с регуляторными последовательностями, которые распознает клетка-хозяин, когда клетку-хозяин трансфицируют вектором экспрессии.

В другом аспекте представлена клетка-хозяин, содержащая одну или несколько различных выделенных нуклеиновых кислот или различные векторы экспрессии, раскрытые в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит одну или несколько различных выделенных нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе. В других вариантах осуществления клетка-хозяин содержит один или несколько различных векторов экспрессии, раскрытых в данном документе.

В еще одном аспекте представлены способы получения антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, включающие: культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор экспрессии, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в культуральной среде в условиях экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Также представлены способы получения антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, включающие: экспрессию вектора экспрессии, который содержит одну или нескольких выделенных нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе, в условиях экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Дополнительно представлены способы получения антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, включающие: экспрессию одной или нескольких выделенных нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе, в условиях экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В определенных вариантах осуществления различных способов получения антител (например различных изотипов V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM или V8-AFM) или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, способ дополнительно включает выделение антигена или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина или культуральной среды, или системы экспрессии *in vitro*.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных клеточных линий, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC). К ним относятся, среди прочего, клетки яичника китайского хомяка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почек детенышей хомячков (BHK), клетки почек обезьян (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например Hep G2), клетки A549, клетки 3T3, клетки HEK-293 и ряд других клеточных линий. Другими клеточными линиями, которые можно использовать, являются клеточные линии насекомых, такие как клетки Sf9, клетки амфибий, бактериальные клетки, клетки растений и клетки грибов. В геном этих клеточных линий могут быть введены различные модификации (например нокаут глутаминсинтетазы, ауксотрофные мутации и так далее) для достижения желаемых свойств клеток-хозяев и/или желаемых свойств экспрессируемых антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

Когда рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие тяжелую цепь или ее антигенсвязывающий фрагмент и/или легкую цепь или ее антигенсвязывающий фрагмент, вводят в клетки-хозяева, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают путем культивирования клеток-хозяев в течение достаточного периода времени для обеспечения экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, для секреции антител или их антигенсвязывающих фрагментов в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева.

Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием

стандартных методов очистки белков.

Как правило, гликопротеины, продуцируемые определенной клеточной линией или трансгенным животным, будут иметь профиль гликозилирования, характерный для гликопротеинов, продуцируемых в клеточной линии или у трансгенных животных. Следовательно, конкретный профиль гликозилирования антитела будет зависеть от конкретной клеточной линии или трансгенного животного, используемого для получения антитела. Однако все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновых кислот, представленными в настоящем документе, или содержащие аминокислотные последовательности, представленные в настоящем документе, включены в настоящее изобретение, независимо от профиля гликозилирования, который могут иметь антитела. Аналогичным образом, в конкретных вариантах осуществления преимущества могут иметь антитела с профилем гликозилирования, включающим только нефукозилированные N-гликаны, поскольку было показано, что эти антитела обычно проявляют более сильную эффективность, чем их фукозилированные аналоги, как *in vitro*, так и *in vivo* (см., например, Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278: 3466-3473 (2003), патенты США №№ 6946292 и 7214775). Эти антитела с нефукозилированными N-гликанами вряд ли будут иммуногенными, поскольку их углеводные структуры являются нормальным компонентом популяции IgG сыворотки человека.

Фармацевтические композиции и введение

В другом аспекте представлена композиция, содержащая антитела против тау-pS413 (например различные изотипы V1-AFM, V2-AFM, V3-AFM, V4-AFM, V5-AFM, V6-AFM, V7-AFM, или V8-AFM) или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит дополнительное средство.

В отдельных вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, эффективное для лечения того же или другого заболевания, для лечения которого используют антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, эффективное для облегчения побочных эффектов антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. Иллюстративные дополнительные средства включают без ограничения: ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты рецепторов HMDA (такие как мемантин), ингибиторы агрегации бета-амилоидных пептидов, антиоксиданты, модуляторы гамма-секретазы, имитаторы фактора роста нервов (NGF) или генную терапию NGF, агонисты PPAR γ , ингибиторы HMS-CoA-редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецепторов GABA, ингибиторы киназы гликогенсинтазы, внутривенный иммуноглобулин, агонисты мускариновых рецепторов, модуляторы никотиновых рецепторов, активный или пассивный бета-амилоидный пептид для иммунизации, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты серотониновых

рецепторов, антитела против бета-амилоидного пептида, гормон роста, нейротрофический фактор, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-4/5, фактор роста фибробластов (FGF)-2 и другие FGF, нейротрофин (NT)-3, эритропоэтин (EPO), фактор роста гепатоцитов (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF)- α 1 β , TGF-бета, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейтурин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), херегулин, нейрегулин, артемин, персефин, интерлейкины, нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GFR), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (CSF), гранулоцитарно-макрофагальный CSF, нетрины, кардиотрофин-1, белки hedgehog, фактор ингибирования лейкемии (LIF), мидкин, плейотрофин, костные морфогенетические белки (BMP), нетрины, сапозины, семафорины, фактор стволовых клеток (SCF) или другое антитело против тау.

Для приготовления фармацевтических или стерильных композиций антител против тау-pS413 или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Готовые формы терапевтических и диагностических средств могут быть приготовлены путем смешивания с приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов или суспензий (см., например, Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

Токсичность и терапевтическую эффективность композиций антител, вводимых отдельно или в комбинации с другим средством, можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (доза, летальная для 50% популяции) и ED50 (доза, терапевтически эффективная у 50% населения). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами составляет терапевтический индекс (LD50/ED50). В конкретных аспектах нужны антитела, демонстрирующие высокие терапевтические индексы. Данные, полученные в результате этих анализов клеточных культур и исследований на животных, можно использовать для определения диапазона

дозировок для применения у человека. Дозировка таких соединений предпочтительно находится в пределах диапазона циркулирующих концентраций, который включает ED₅₀ с незначительной токсичностью или без токсичности. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и пути введения.

В дополнительном варианте осуществления композицию, содержащую антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, вводят субъекту в соответствии со справочником Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57-е издание (November 1, 2002)).

Способ введения может варьироваться. Подходящие пути введения включают пероральный, ректальный, чресслизистый, кишечный, парентеральный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный, интрамедуллярный, интратекальный, прямой внутрижелудочковый, внутривенный, внутрибрюшинный, интраназальный, внутриглазной, ингаляционный, инсуффляционный, местный, накожный, трансдермальный или внутриартериальный.

В конкретных вариантах осуществления антитело против тау-pS413 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить инвазивным путем, таким как инъекция (см. выше). В дополнительных вариантах осуществления изобретения антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты, или их фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно, интратекально, внутримышечно или интрацеребрально. В одном отдельном варианте осуществления антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты, или их фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В другом отдельном варианте осуществления антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты, или их фармацевтическую композицию вводят подкожно. В еще одном отдельном варианте осуществления антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты, или их фармацевтическую композицию вводят интратекально. В еще одном отдельном варианте осуществления антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты, или их фармацевтическую композицию вводят внутримышечно. В еще одном отдельном варианте осуществления антитела против тау-pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты, или их фармацевтическую композицию вводят интрацеребрально.

Композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в данной области. Например, фармацевтическую композицию согласно изобретению можно вводить путем инъекции с помощью иглы для подкожных инъекций, включая, например, предварительно заполненный шприц или автоинжектор.

Фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, также можно вводить путем инфузии.

Схема введения зависит от нескольких факторов, включая метаболизм терапевтических антител в сыворотке или ткани, соотношение терапевтических антител, проникающих через гематоэнцефалический барьер, уровень симптомов, иммуногенность

терапевтических антител и доступность клеток-мишеней в биологической матрице. Предпочтительно, чтобы по схеме введения доставляли достаточное количество терапевтических антител для улучшения состояния целевого заболевания, одновременно сводя к минимуму нежелательные побочные эффекты. Соответственно, количество доставляемого биологического препарата частично зависит от конкретных терапевтических антител и тяжести состояния, подлежащего лечению. Доступно руководство по выбору соответствующих доз терапевтических антител (см., например, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

Подходящую дозу определяет клиницист, например, с использованием параметров или факторов, известных или предполагаемых в данной области, влияющих на лечение. Как правило, доза начинается с количества, несколько меньшего, чем оптимальная доза, и затем ее увеличивают небольшими приращениями до тех пор, пока не будет достигнут желаемый или оптимальный эффект по сравнению с любыми негативными побочными эффектами. В общем, желательно, чтобы биологический препарат, который будет использован, был получен из того же вида, что и животное, предназначенное для лечения, что сводит к минимуму любой иммунный ответ на реагент. Например, в случае субъектов-людей могут быть желательны химерные, гуманизированные и полностью человеческие антитела.

Как описано ранее, антитела против γ -pS413 или их антигенсвязывающие фрагменты можно вводить совместно с одним или несколькими дополнительными средствами. Антитело может быть связано со средством (в виде иммунокомплекса), или его можно вводить отдельно от средства (фиксированная доза). В последнем случае (отдельное введение) антитело можно вводить до, после или одновременно со средством или можно вводить совместно с другими известными терапевтическими средствами.

Наборы

Также в настоящем документе представлены наборы, содержащие антитело (например антитело против γ -pS413), представленное в настоящем документе, или его композицию (например фармацевтическую композицию), упакованные в подходящий упаковочный материал. Набор необязательно включает этикетку или вкладыш в упаковку, включающий описание компонентов или инструкции по применению содержащихся в нем компонентов *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Термин «упаковочный материал» относится к физической структуре, содержащей компоненты набора. Упаковочный материал может сохранять стерильность компонентов и может быть изготовлен из материала, обычно используемого для таких целей (например

из бумаги, гофрированного волокна, стекла, пластика, фольги, ампул, флаконов, пробирок и так далее).

Представленные в данном документе наборы могут содержать этикетки или вкладыши. Этикетки или вкладыши включают «печатные материалы», например, бумагу или картон, отдельные или прикрепленные к компоненту, набору или упаковочному материалу (например коробке) или прикрепленные, например, к ампуле, тубе или флакону, содержащему компоненты набора. Этикетки или вкладыши могут дополнительно включать машиночитаемый носитель, такой как диск (например жесткий диск, карта, диск памяти), оптический диск, такой как CD- или DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, магнитная лента или электрические носители данных, такие как RAM и ROM, или их гибриды, такие как магнитные/оптические носители данных, флэш-носители или карты памяти. Этикетки или вкладыши могут содержать информацию, идентифицирующую информацию о производителе, номере партии, местонахождении производителя и дате.

Представленные в данном документе наборы могут дополнительно содержать другие компоненты. Каждый компонент набора может быть заключен в отдельный контейнер, и все различные контейнеры могут находиться в одном пакете. Наборы также могут быть предназначены для хранения в холодильнике. Кроме того, набор может быть разработан так, чтобы он содержал антитела, представленные в настоящем документе, или клетки, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, представленные в настоящем документе. Клетки в наборе можно хранить в соответствующих условиях хранения до тех пор, пока они не будут готовы к использованию.

Общие методы

Стандартные методы молекулярной биологии описаны в Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Стандартные методы также представлены в Ausbel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, в которых описано клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжах (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белков (том 3) и биоинформатика (том 4).

Описаны способы очистки белка, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию (Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Описаны химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, получение слитых белков, гликозилирование белков (см., например, Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis,

MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) BioDirectory, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Описаны получение, очистка и фрагментация поликлональных и моноклональных антител (Coligan, et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY; Harlow and Lane, см. выше). Доступны стандартные методики для характеристики взаимодействий лиганд/рецептор (см., например, Coligan, et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Могут быть получены моноклональные, поликлональные и гуманизированные антитела (см., например, Sheperd and Dean (eds.) (2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann and Dubel (eds.) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, New York; Harlow and Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139-243; Carpenter, et al. (2000) *J. Immunol.* 165:6205; He, et al. (1998) *J. Immunol.* 160:1029; Tang et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:27371-27378; Baca et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Chothia et al. (1989) *Nature* 342:877-883; Foote and Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; U.S. Pat. No. 6,329,511).

Альтернативой гуманизации является использование библиотек человеческих антител, отображаемых на фагах, или библиотек человеческих антител у трансгенных мышей (Vaughan et al. (1996) *Nature Biotechnol.* 14:309-314; Barbas (1995) *Nature Medicine* 1:837-839; Mendez et al. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Hoogenboom and Chames (2000) *Immunol. Today* 21:371-377; Barbas et al. (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Kay et al. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin et al. (1999) *Nature Biotechnol.* 17:397-399).

Доступны методы проточной цитометрии, включая сортировку активированных флуоресценцией клеток (FACS) (см., например, Owens, et al. (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Доступны флуоресцентные реагенты, подходящие для модификации нуклеиновых кислот, включая праймеры для нуклеиновых кислот и зонды, полипептиды и антитела для использования, например, в качестве диагностических реагентов (Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO).

Описаны стандартные методы гистологии иммунной системы (см., например, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, et al. (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, et al. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY).

Доступны программные пакеты и базы данных для определения, например, антигенных фрагментов, лидерных последовательностей, укладки белков, функциональных доменов, сайтов гликозилирования и выравнивания

последовательностей (см., например, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, et al. (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne, et al. (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren, et al. (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

Пример 1. Созревание аффинности и точечная мутация

HmzTa1505-hIgG4-S228P представляет собой гуманизированное антитело, полученное из мышиноного исходного антитела Ta1505-mIgG2a, подробности которого описаны в WO 2018/254390.

Созревание аффинности HmzTa1505-hIgG4-S228P проводили с помощью скрининга дрожжевого дисплея библиотеки созревания аффинности, разработанной на основе структуры. Дизайн библиотеки основан на кристаллической структуре apo Ta1505 Fab с введением 79:7:7:7 неэквивалентных (допированных) частично рандомизированных мутаций на уровне ДНК в открытые растворителем остатки CDR тяжелой и легкой цепей. Были созданы и проверены три исходные библиотеки; библиотеки состояли из мутаций в CDR-H1/H2 (всего 9 остатков), CDR-H3 (всего 8 остатков) и CDR-VL (всего 12 остатков). Сортировку дрожжевых клеток с помощью FACS, меченных биотинилированным пептидом тау-pS413 и легкой цепью против каппа, использовали для выделения кандидатов с повышенной аффинностью при сохранении фосфоспецифичности. Отсортированные с помощью FACS результаты из исходных библиотек позже объединяли для создания окончательной комбинированной библиотеки дрожжевого дисплея VH/VL для синергетического улучшения и подвергали скринингу таким же образом. Тридцать кандидатов из объединенной библиотеки были переформатированы в изотип hIgG4-S228P и получены рекомбинантно с последующим анализом Biacore и белка. Одним из лучших кандидатов был V1-AFM-hIgG4-S228P, который продемонстрировал 10-кратное улучшение одновалентной аффинности и более чем 40-кратное улучшение связывания с фосфорилированным тау-белком в спинномозговой жидкости (CSF) пациентов с AD по сравнению с HmzTa1505-hIgG4-S228P (см. **таблицу 8**).

VH или VL из лучших кандидатов по созреванию аффинности меняли местами и сопоставляли с VL или VH из другого лучшего кандидата для получения большего количества вариантов антител.

Дополнительная мутация (K54E или K54D) в различных VH была идентифицирована с помощью структурного дизайна с целью выявления мутаций, которые снижали изоэлектрическую точку (pI) при сохранении или улучшении аффинности. Дизайн был основан на вычислительном мутагенезе с насыщением и сокристалле Ta1505 Fab, связанным с пептидом тау-pS413.

Например, добавление K54E к VH V1-AFM генерировало V6-AFM. V6-AFM-hIgG1-LALA-YTE показал более низкий pI (8,54) по сравнению с V1-AFM-hIgG1-LALA-

YTE (pI=8,87). По сравнению с V1-AFM, V6-AFM проявлял улучшенную моновалентную аффинность к tau-pS413 для всех 3 протестированных изотипов (hIgG1-LALA, hIgG1-LALA-YTE и hIgG4-S228P) (см. таблицу 8). Неожиданно V6-AFM продемонстрировал лучшую выработку молекул антител с изотипом IgG1-LALA (данные не показаны) и изотипу IgG1-LALA-YTE (фиг. 6) по сравнению с V1-AFM.

В другом варианте осуществления мутация K54E в VH V2-AFM была заменена на K54D. По сравнению с эталонным антителом (pI=8,28), имеющим K в положении 54 VH V2-AFM, мутации E и D в положении 54 снижали pI до 7,58. Кроме того, мутации K54E и K54D увеличивали KD эталонного антитела в 1,9 и 1,4 раза соответственно.

Наконец, к VH различных иллюстративных антител добавляли константные области различных изотипов тяжелых цепей (например IgG1, IgG1-LALA, IgG1-LALA-YTE, IgG4, IgG4-S228P).

Иллюстративные полученные антитела описаны в **таблице 4**. Соответствующие SEQ ID NO для различных VH и VH-CDR (определенные по системе нумерации Kabat) приведены в **таблице 5**, а SEQ ID NO для различных VL и VL-CDR (определенные по системе нумерации Kabat) приведены в **таблице 6**. Чтобы проиллюстрировать, как различные системы нумерации CDR влияют на последовательности CDR в антителе, CDR V8-AFM, определяемые общепринятыми системами нумерации, приведены в **таблице 7**.

Таблица 4. Примеры антител

Антите ло Name	Тяжела я Цепь Изотип	VH	VL	Описание (тяжелая цепь/легкая цепь)
Ta1505- mIgG2a	mIgG2a	Ta1505- VH	Ta1505-VL	Мышиное x [MAPT_H] mAb (Ta1505) IgG2a/Каппа
V0- hIgG1	hIgG1	VH11	VL46	Гуманизированное x [MAPT_H] mAb (Ta1505 VL46/VH11) IgG1/Каппа (CX)
V0- hIgG4- S228P	hIgG4 (S228P)	VH11	VL46	Гуманизированное x [MAPT_H] mAb (Ta1505 VL46/VH11) IgG4 S228P/Каппа (CX)
HmzTa1 505- hIgG4- S228P	hIgG4 (S228P)	VH11	VL46_G34 A_S28N	Гуманизированное x [MAPT_H] mAb (Ta1505-VL46_G34A_S28N/VH11) IgG4 S228P/Каппа (CX)
V1- AFM- hIgG4- S228P	hIgG4 (S228P)	VH11_A59 V_D68G	VL46_G34 A_S28N_Q 27H_S32R_ H98Y	Гуманизированное Модифицированное x [MAPT_H] mAb (Ta1505- VH11_A59V_D68G/VL46_G34A_S28N_ Q27H_S32R_H98Y) IgG4 S228P/Каппа

				(CX)
V1- AFM- hIgG1- LALA	hIgG1 (LALA)	VH11_A59 V_D68G	VL46_G34 A_S28N_Q 27H_S32R_ H98Y	Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505- VH11_A59V_D68G/VL46_G34A_S28N_ Q27H_S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A/Каппа (CX)
V1- AFM- hIgG1- LALA- YTE	hIgG1 (LALA YTE)	VH11_A59 V_D68G	VL46_G34 A_S28N_Q 27H_S32R_ H98Y	Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505- VH11_A59V_D68G/VL46_G34A_S28N_ Q27H_S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A YTE/Каппа (CX)
V2- hIgG1- LALA	hIgG1 (LALA)	VH11_D68 G_K54E	VL46_G34 A_S28N_Q 27H_S32R_ H98Y	Гуманизированное Модифицированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505- VH11_D68G_K54E/VL46_G34A_S28N_ Q27H_S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A/Каппа (CX)
V2- hIgG1- LALA- YTE	hIgG1 (LALA YTE)	VH11_D68 G_K54E	VL46_G34 A_S28N_Q 27H_S32R_ H98Y	Гуманизированное Модифицированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505- VH11_D68G_K54E/VL46_G34A_S28N_ Q27H_S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A YTE/Каппа (CX)
V3- AFM- hIgG4- S228P	hIgG4 (S228P)	VH11_D68 G	VL46_G34 A_S28K_S3 2R_H98Y	Гуманизированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VH11_D68G/Ta1505- VL46_G34A_S28K_S32R_H98Y) IgG4 S228P/Каппа (CX)
V4- AFM- hIgG1- LALA	hIgG1 (LALA)	VH11_D68 G_K54E	VL46_G34 A_S28K_S3 2R_H98Y	Гуманизированное Модифицированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505- VH11_D68G_K54E/VL46_G34A_S28K_ S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A/Каппа (CX)
V4- AFM- hIgG1- LALA-	hIgG1 (LALA YTE)	VH11_D68 G_K54E	VL46_G34 A_S28K_S3 2R_H98Y	Гуманизированное Модифицированное x [МАРТ_Н] mAb (Ta1505- VH11_D68G_K54E/VL46_G34A_S28K_ S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A

YTE				YTE/Каппа (CX)
V5-AFM-hIgG4-S228P	hIgG4 (S228P)	VH11_A59 V_D68G	VL46_G34 A_S28K_S3 2R_H98Y	Гуманизированное х [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VH11_A59V_D68G/VL46_G34A_S28K_S32R_H98Y) IgG4 S228P/Каппа (CX)
V6-AFM-hIgG4-S228P	hIgG4 (S228P)	VH11_A59 V_D68G_K54E	VL46_G34 A_S28N_Q 27H_S32R_H98Y	Гуманизированное Модифицированное х [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VH11_A59V_D68G_K54E/VL46_G34A_S28N_Q27H_S32R_H98Y) IgG4 S228P/Каппа (CX)
V6-AFM-hIgG1-LALA	hIgG1 (LALA)	VH11_A59 V_D68G_K54E	VL46_G34 A_S28N_Q 27H_S32R_H98Y	Гуманизированное Модифицированное х [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VH11_A59V_D68G_K54E/VL46_G34A_S28N_Q27H_S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A/Каппа (CX)
V6-AFM-hIgG1-LALA-YTE	hIgG1 (LALA YTE)	VH11_A59 V_D68G_K54E	VL46_G34 A_S28N_Q 27H_S32R_H98Y	Гуманизированное Модифицированное х [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VH11_A59V_D68G_K54E/VL46_G34A_S28N_Q27H_S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A YTE/Каппа (CX)
V7-AFM-hIgG4-S228P	hIgG4 (S228P)	VH11	VL46_G34 A_S28N_Q 27R_S32R_H98Y	Гуманизированное х [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VH11/VL46_G34A_S28N_Q27R_S32R_H98Y) IgG4 S228P/Каппа (CX)
V7-AFM-hIgG1-LALA	hIgG1 (LALA)	VH11	VL46_G34 A_S28N_Q 27R_S32R_H98Y	Гуманизированное х [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VH11/VL46_G34A_S28N_Q27R_S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A/Каппа (CX)
V7-AFM-hIgG1-LALA-YTE	hIgG1 (LALA YTE)	VH11	VL46_G34 A_S28N_Q 27R_S32R_H98Y	Гуманизированное х [МАРТ_Н] mAb (Ta1505-VH11/VL46_G34A_S28N_Q27R_S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A YTE/Каппа (CX)
V8-	hIgG4	VH11_A59	VL46_G34	Гуманизированное Модифицированное

AFM-hIgG4-S228P	(S228P)	V_D68G_K54E	A_S28K_S32R_H98Y	x [MAPT_H] mAb (Ta1505-VH11_A59V_D68G_K54E/VL46_G34A_S28K_S32R_H98Y) IgG4 S228P/Каппа (CX)
V8-AFM-hIgG1-LALA	hIgG1 (LALA)	VH11_A59V_D68G_K54E	VL46_G34A_S28K_S32R_H98Y	Гуманизированное Модифицированное x [MAPT_H] mAb (Ta1505-VH11_A59V_D68G_K54E/VL46_G34A_S28K_S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A/Каппа (CX)
V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE	hIgG1 (LALA YTE)	VH11_A59V_D68G_K54E	VL46_G34A_S28K_S32R_H98Y	Гуманизированное Модифицированное x [MAPT_H] mAb (Ta1505-VH11_A59V_D68G_K54E/VL46_G34A_S28K_S32R_H98Y) IgG1 L234A L235A YTE/Каппа (CX)

Таблица 5. SEQ ID NO для VH и VH-CDR (определенные по системе нумерации Kabat)

Название тяжелой цепи	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3	VH
VH11_D68G	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:44
VH11_A59V_D68G	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48
VH11_D68G_K54E	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:52
VH11_A59V_D68G_K54E	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:56
VH11	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24

Таблица 6. SEQ ID NO для VL и VL-CDR (определенные по системе нумерации Kabat)

Название легкой цепи	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3	VL
VL46_G34A_S28N_Q27R_S32R_H98Y	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32
VL46_G34A_S28K_S32R_H98Y	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36

VL46_G34A_S28N_Q27H_S32R_H98 Y	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40
VL46_G34A_S28N	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28
VL46	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20

Таблица 7. Последовательности CDR V8-AFM, определяемые по различным системам нумерации

Название CDR	Kabat	AbM	Chothia	Contact	IMGT
VL-CDR1	RSSQKIVH RNANTYL E (SEQ ID NO:33)	RSSQKIVHR NANTYLE (SEQ ID NO:83)	RSSQKIVH RNANTYLE (SEQ ID NO:89)	VHRNANTY LEWY (SEQ ID NO:95)	QKIVHRNA NTY (SEQ ID NO:101)
VL-CDR2	TVSNRFS (SEQ ID NO:34)	TVSNRFS (SEQ ID NO:84)	TVSNRFS (SEQ ID NO:90)	LLIYTVSNR F (SEQ ID NO:96)	TV (SEQ ID NO:102)
VL-CDR3	FQGSYLPL T (SEQ ID NO:35)	FQGSYLPLT (SEQ ID NO:85)	FQGSYLPL T (SEQ ID NO:91)	FQGSYLPL (SEQ ID NO:97)	FQGSYLPLT (SEQ ID NO:103)
VH-CDR1	SFALN (SEQ ID NO:53)	GFTFSSFALN (SEQ ID NO:86)	GFTFSSF (SEQ ID NO:92)	SSFALN (SEQ ID NO:98)	GFTFSSFA (SEQ ID NO:104)
VH-CDR2	HIRSETNN YVTFYAA SVKG (SEQ ID NO:54)	HIRSETNNY VTF (SEQ ID NO:87)	RSETNNYV (SEQ ID NO:93)	WVGHIRSET NNYVTF (SEQ ID NO:99)	IRSETNNYV (SEQ ID NO:105)
VH-CDR3	RGPRDSW FGY (SEQ ID NO:55)	RGPRDSWFG Y (SEQ ID NO:88)	RGPRDSWF GY (SEQ ID NO:94)	VRRGPRDS WFG (SEQ ID NO:100)	VRRGPRDS WFGY (SEQ ID NO:106)

Выравнивание последовательностей между иллюстративными VH показано на **фиг. 1A**, а выравнивание последовательностей между иллюстративными VL показано на **фиг. 1B**.

Пример 2. Определение аффинности связывания с пептидом Тау-pS413 с помощью

Поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Анализ SPR использовали для определения аффинности моновалентного связывания mAb с пептидом тау-pS413 (SEQ ID NO:109). Антитела были связаны по аминогруппе с сенсорным чипом CM5 примерно по 1000 RU каждое. Анализы связывания проводили с использованием рабочего буфера HBS-EP, содержащего 3 mM EDTA и 0,05% Tween-20, pH 7,4. Титрующие концентрации (200 нМ максимум для HmzTa1505-hIgG4-S228P, 80 нМ максимум для всех других mAb, 6 точек, серия 2,5-кратных разведений и два нулевых) пептида тау-pS413 инъецировали на иммобилизованные mAb. Для каждой инъекции обеспечивали возможность связывания пептида тау-pS413 в течение 180 секунд с последующей диссоциацией в течение 900 секунд. За каждой инъекцией образца следовала инъекция 20 mM ацетата натрия, pH 3,5, в течение 60 секунд для регенерации поверхности для последующей инъекции. Все анализы проводили на приборах Biacore T200 и/или 4000 (GE Healthcare), и данные соответствовали модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Biaevaluation. Аффинность рассчитывали по константам скорости ассоциации и диссоциации как $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Все mAb связывали пептид тау-pS413 (таблица 8). Все варианты антител с созревшей аффинностью (от V1-AFM до V8-AFM) демонстрировали увеличение аффинности от примерно 2 до примерно 30 раз по сравнению с HmzTa1505-hIgG4-S228P.

Таблица 8. Аффинность связывания иллюстративных антител с пептидом тау-pS413

Таблица 8. Аффинность связывания иллюстративных антител с пептидом тау-pS413

Название антитела	KD (M) среднее	KD HmzTa1505-hIgG4-S228P/KD (кратность изменения)
Ta1505-mIgG2a	9,40E-09	3,09
V0-hIgG1	2,43E-08	1,19
V0-hIgG4-S228P	3,93E-08	0,74
HmzTa1505-hIgG4-S228P	2,90E-08	1,00
V1-AFM-hIgG4-S228P	2,81E-09	10,31
V1-AFM-hIgG1-LALA	1,40E-09	20,66
V1-AFM-hIgG1-LALA-YTE	1,74E-09	16,67
V2-AFM-hIgG1-LALA	1,87E-09	15,51
V2-AFM-hIgG1-LALA-YTE	1,96E-09	14,80
V3-AFM-hIgG4-S228P	1,31E-08	2,22
V4-AFM-hIgG1-LALA	6,83E-09	4,25
V4-AFM-hIgG1-LALA-YTE	3,26E-09	8,89
V5-AFM-hIgG4-S228P	3,57E-09	8,12

V6-AFM-hIgG4-S228P	1,35E-09	21,43
V6-AFM-hIgG1-LALA	1,02E-09	28,50
V6-AFM-hIgG1-LALA-YTE	9,75E-10	29,77
V7-AFM-hIgG4-S228P	4,34E-09	6,69
V7-AFM-hIgG1-LALA	4,36E-09	6,65
V7-AFM-hIgG1-LALA-YTE	3,82E-09	7,59
V8-AFM-hIgG4-S228P	2,26E-09	12,81
V8-AFM-hIgG1-LALA	1,76E-09	16,52
V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE	1,92E-09	15,13

Пример 3. Высокоаффинные антитела против тау-pS413 специфически связываются с тау-пептидом, фосфорилированным по серину 413.

Специфичность связывания описанных в данном документе высокоаффинных антител оценивали с различными тау-пептидами с помощью ELISA с пептидным покрытием. Планшеты покрывали 50 мкл 1 мкг/мл пептидов 69AXY, 70AXY, 74AXY, 84AWK, 25AWF или 24AWF в PBS в течение ночи при 4°C. На следующий день планшеты промывали 3 раза, блокировали 200 мкл superbloc в течение 1 часа при комнатной температуре, затем снова промывали 3 раза. Антитела разводили серийными разведениями 1:5 в буфере для ELISA, начиная с 10 мкг/мл. Планшеты инкубировали с 50 мкл серийно разведенных антител при комнатной температуре в течение 1 часа и промывали 3 раза. Затем планшеты инкубировали с 50 мкл козьих антимышиных IgG-HRP (Southern Biotech, cat# 1030-05) или козьих античеловеческих IgG-HRP (Jackson Immunologics, cat# 109-036-0980) в разведении 1:3000 в буфере ELISA в течение 45 минут при комнатной температуре, промывали 5 раз, затем проявляли с помощью ABTS в течение 5 минут при комнатной температуре и считывали при OD 405 нм.

На **фиг. 2А-2F** показано связывание иллюстративных антител (V8-AFM-IgG1-LALA, V8-AFM-IgG1-LALA-YTE, V8-AFM-IgG4-S228P, V5-AFM-IgG4-S228P). Например, все они специфически связываются с тау-пептидом с фосфорилированным серином 413 [PD17(p)PS413 (24AWF), SEQ ID NO:77] (**фиг. 2А**), но не связываются с тем же пептидом без фосфорилированного серина 413, [PD17 (25AWF), SEQ ID NO:78] (**фиг. 2В**). Кроме того, они не связываются с пептидами, которые фосфорилированы в положениях, отличных от серина 413, таких как pS396/400/404GC (84AWK, SEQ ID NO:79), pT212/pS214GC (69AXY, SEQ ID NO:80), T- pT217GC (70AXY, SEQ ID NO:82) или pSer412Cys (74AXY, SEQ ID NO:81) (**фиг. 2С-2F**). Контрольное антитело, гуманизированное антитело против RSV, не связывается ни с одним из протестированных пептидов (**фиг. 2А-2F**).

Пример 4. Аффинность связывания высокоаффинных антител против тау-pS413 с FcRn при pH 6 и pH 7,4

Анализ SPR использовали для определения аффинности связывания описанных в

данном документе высокоаффинных антител с FcRn человека и яванского макака (супо) при pH 6,0 и 7,4. Антитело против каппа-цепи человека связывали амином с чипом CM5. Каждое антитело было захвачено на 200-300 RU. Анализы связывания проводили с использованием рабочего буфера PBS, содержащего 0,05% Tween-20, с доведенным pH до 6,0 или 7,4. Образцы для титрования также готовили с использованием соответствующего буфера pH для анализа. Титрующие концентрации (1200 нМ в верхней части, 6 точек, 3-кратная серия разведений и два нулевых) FcRn человека или яванского макака инъецировали на захваченные mAb. За каждой инъекцией образца следовали две 30-секундные инъекции 10 mM глицина, pH 1,5 и 12-секундная инъекция 10 mM NaOH для регенерации поверхности для последующего захвата и инъекции антител. Все анализы проводились на приборах Biacore T200 и/или 4000 (GE Healthcare), а данные соответствовали стационарной аппроксимационной модели с использованием программного обеспечения Biaevaluation. Аффинность при pH 6,0 рассчитывали как эквивалентную концентрации при полумаксимальном сигнале связывания в приближении стационарного состояния (таблица 9). Как и ожидалось, при pH 7,4 связывание не обнаруживалось (данные не показаны).

Аффинность высокоаффинных антител против тау-pS413 при pH 6,0 находилась в обычном диапазоне для FcRn. Из-за мутации YTE V8-AFM-IgG1-LALA-YTE показал примерно в 6,5 и примерно в 11 раз более высокую аффинность в отношении FcRn человека и яванского макака, соответственно (таблица 9).

Таблица 9. Аффинность связывания антител против тау-pS413 с FcRn человека и яванского макака

Название антитела	FcRn человека	Кратность изменения человеческого FcRn (по сравнению с HmzTa1505-hIgG4-S228P)	Супо FcRn	Кратность изменения Супо FcRn (по сравнению с HmzTa1505-hIgG4-S228P)
V8-AFM- hIgG1 LALA	2,3E-07	1	1,6E-07	1,6
V8-AFM- hIgG1 LALA-YTE	3,4E-08	6,5	2,4E-08	11
V8-AFM- hIgG4-S228P	2,1E-07	1	2,6E-07	1
HmzTa1505-hIgG4-S228P	2,2E-07	1	2,6E-07	1

Пример 5. Аффинность связывания высокоаффинных антител против тау-pS413 с гомогенатами головного мозга и образцами CSF от пациентов с AD и в доклинических моделях с помощью конкурентного ELISA

Аффинность связывания различных антител против тау-pS413, описанных в настоящем документе, для эндогенных видов тау определяли в гомогенатах головного мозга и образцах CSF от пациентов с AD и в доклинических моделях. Вкратце, образцы предварительно инкубировали с различными концентрациями различных антител против тау-pS413 или соответствующими изотипическими контролями. После одночасового периода предварительной инкубации смесь антиген-антитело (Ag-Ab) добавляли в планшеты, предварительно покрытые антителами, захватывающими общий тау-белок (набор Innostest ELISA). Затем несвязанный («свободный») тау-pS413 в гомогенате головного мозга или образце CSF обнаруживали с помощью биотинилированного антитела Ta1505-mIgG2a.

Экстракты P2 (фракции) готовили следующим образом. Десять граммов ткани префронтальной коры (ABS Inc) погружали в буфер искусственного CSF (aCSF: 119 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM NaH_2PO_4 , 1,3 mM MgSO_4 , 2,5 mM CaCl_2 , 26 mM NaHCO_3), 11 mM глюкозы, 10 mM HEPES, pH 7,4 и стерильная вода) с ингибиторами протеазы и фосфатазы (Pierce) при разведении ткань/буфер 1:5 (м/о). Ткань гомогенизировали с помощью диссоциатора GentleMACS. Лизированную ткань центрифугировали при 3000 g в течение 20 минут при 4°C. Супернатанты переносили в поликарбонатные центрифужные пробирки на 50 мл и центрифугировали при 27000 g в течение 20 минут при 4°C. Супернатанты собирали (фракция S1) и далее центрифугировали при 150000 g в течение 20 минут при 4°C. Осадок ресуспендировали, фракция P2, в буфере aCSF с ингибиторами протеазы и фосфатазы и обрабатывали ультразвуком в течение нескольких секунд с использованием ультразвукового зонда. Концентрацию фракции P2 определяли с помощью анализа белка BCA (Pierce), фракцию P2 делили на аликвоты и хранили при -80°C.

На фиг. 3A показаны необработанные данные, показывающие снижение уровней «свободного» несвязанного антигена в экстрактах P2 гомогенатов головного мозга при AD с увеличением концентрации mAb, но без изотипического контроля. На фиг. 3B показаны преобразованные данные, в которых значения оптической плотности (OD) значений OD hIgG изотипического контроля («всего») вычитали из тестируемых mAb («свободных») и нормализовали для расчета занятия EC50 профилированных mAb (таблица 10). Эти исследования демонстрируют, что репрезентативные высокоаффинные антитела против тау-pS413 связываются с гомогенатами головного мозга при AD сравнительно со значительно более высокой аффинностью, чем HmzTa1505-hIgG4-S228P.

Таблица 10. Аффинность связывания антител против тау-pS413 с гомогенатами головного мозга при AD

Название антитела	EC50 (M)
HmzTa1505-hIgG4-S228P	6,50E-10

V1-AFM-hIgG4-S228P	3,23E-11
V1-AFM-hIgG1-LALA-YTE	3,10E-11
V2-AFM-hIgG1-LALA	3,90E-11
V3-AFM-hIgG4-S228P	2,55E-11
V5-AFM-hIgG4-S228P	3,10E-11
V6-AFM-hIgG4-S228P	2,23E-11
V7-AFM-hIgG1-LALA-YTE	4,10E-11
V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE	2,60E-11
V8-AFM-hIgG1-LALA	2,60E-11
V8-AFM-hIgG4-S228P	2,50E-11

Описанные в данном документе высокоаффинные антитела против тау-pS413 также связываются с видами тау в гомогенатах головного мозга мутантных тау-мышей (rTg(tauP301L)4510) (Ramsden M et al., 2005, J.Neurosci. 25 (46) 10637-10647) и в CSF пациентов с AD после вскрытия и африканских зеленых обезьян. Гомогенаты тканей готовили с использованием 1% саркозиевого буфера с несколькими стадиями высокоскоростного центрифугирования для обогащения нерастворимыми белками, включая тау. Показатели связывания нельзя было оценить в CSF мышей с мутантным тау из-за ограниченного объема. «Эффективные» способности связывания HmzTa1505-hIgG4-S228P и V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE в отношении эндогенного тау-белка в различных биологических образцах примерно в 2-10 раз выше, чем соответствующие способности мономера рекомбинантного фосфорилированного тау-белка, используемого в качестве стандарта (таблица 11). Эти результаты предполагают, что антитела против тау-pS413 связываются с компонентом avidности с целевыми видами тау. Связывающая активность V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE в отношении этих видов биологического тау также примерно в 30-200 раз выше, чем у HmzTa1505-hIgG4-S228P (таблица 11).

Таблица 11. Потенциал связывания с видами тау в гомогенатах головного мозга и образцах CSF пациентов с AD и в доклинических моделях

Образцы	Описание	HmzTa1505-hIgG4-S228P EC50 (нМ)	V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE EC50 (нМ)
Мономер фосфорилированного тау- белка	35 AWM (1 нг)	6,73	0,055
Головной мозг при AD	Гранула	0,65	0,022

	высокоскоростного центрифугирования P2 (50 нг белков)		
Головной мозг мышей с мутантным Тау	Посев SI Тау (4 нг белка)	0,67	0,004
CSF при вскрытии при AD	пациенты с AD (75 мкл чистого CSF)	0,82 (среднее, n=3)	0,004 (среднее, n=2)
Свежий CSF африканской зеленой обезьяны (AGM)	4 AGM (75 мкл чистого CSF)	2,08 (среднее, n=4)	0,008 (среднее, n=2)

Пример 6. Клеточная активность нейтрализации In vitro анализа посева в нейронах hu-iPSC

Для оценки и сравнения активности HmzTa1505-hIgG4-S228P и репрезентативных высокоаффинных антител V1-AFM-hIgG4-S228P и V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE в патологической клеточной системе была разработана модель посева при тау-патологии в нейронах, полученных из iPSC человека, с использованием экстрактов (P2) из гомогенатов головного мозга пациентов с AD. Этот анализ нейтрализации состоял из иммунодеплетирования видов тау из гомогенатов P2 головного мозга при AD с тау-антителами или изотипическим контролем перед посевом экстракта P2 в культуру нейронов hu-iPSC. Иммунодеплецию проводили с использованием белка G Dynabeads после предварительной инкубации 4 мкг общего белка экстракта P2 с разной концентрацией mAbs или соответствующего изотипического контроля (от 3 нМ до 3 пМ) тау-антител или изотипического контроля в течение 4 часов. Через пять дней после обработки нейроны иммуноокрашивали антителами MC1, mAb тау, специфичным для патологической конформации тау (предоставлено доктором Питером Дэвисом, отделение патологии, Медицинский колледж Альберта Эйнштейна). Патологию тау определяли количественно с помощью анализа изображений с высоким содержанием, основанного на иммуноокрашивании антител MC1. (Репрезентативные изображения на **фиг. 4D**). Этот анализ нейтрализации состоит из иммуноистощающих видов тау из экстрактов P2 с HmzTa1505-hIgG4-S228P, V1-AFM-hIgG4-S228P, V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE или соответствующего изотипического контроля перед посевом экстракта P2 в нейронах hiPSC (как описано на схематическом изображении на **фиг. 4A**).

Иммуноистощенные образцы тестировали в анализе AlphaLISA® для подтверждения успешного иммуноистощения видов общего тау (пара антител Tau5/HT7, **фиг. 4C**) или тау-pS413 (пара антител pTa1505 IgG2a/HT7, **фиг. 4B**) с помощью HmzTa1505-hIgG4-S228P, V1-AFM-hIgG4-S228P или V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE. Вкратце, иммуноистощенные образцы инкубировали с акцепторными шариками HT7 (Thermofisher) (конечная концентрация 20 мкг/мл) и биотинилированными антителами

Tau5 (ThermoFisher) или Ta1505 (0,6 мкг/мл) в течение 2 часов в буфере для иммунологического анализа при комнатной температуре. Затем в планшет добавляли шарики донора стрептавидина (конечная концентрация 40 мкг/мл), и инкубировали еще в течение 1 часа при комнатной температуре при осторожном встряхивании, а затем планшеты считывали с помощью планшет-ридера Envision (Perkin Elmer). Результаты показали эффективное осаждение 70-90% видов тау-pS413 и 50% всех видов тау, полученное с 0,1 нМ высокоаффинного варианта V1-AFM-hIgG4-S228P или V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE по сравнению с 3 нМ HmzTa1505-hIgG4-S228P (фиг. 4B и 4C).

Через пять дней после обработки нейроны иммуноокрашивали антителами MC1. Анализ изображений с высоким содержанием показал, что нейтрализация с помощью HmzTa1505-hIgG4-S228P, V1-AFM-hIgG4-S228P или V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE значительно уменьшала патологию тау MC1 в нейронах; однако максимальное ингибирование ~70-90% патологии тау наблюдалось при использовании 0,1 нМ высокоаффинного варианта V1-AFM-hIgG4-S228P или V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE по сравнению с 3 нМ HmzTa1505-hIgG4-S228P (фиг. 4E). Эти результаты демонстрируют, что mAb против тау-pS413 могут эффективно распознавать токсичные виды тау, обнаруженные в головном мозге пациентов с AD. Кроме того, высокоаффинные варианты V1-AFM-hIgG4-S228P и V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE в 30 раз более эффективны, чем HmzTa1505-hIgG4-S228P, для нейтрализации эффектов токсичных видов тау, вызывающих патологию тау в модели нейронных клеток человека.

Пример 7. Эффективность антител против тау-pS413 в модели инъекции в гиппокамп тау-белка, полученного при болезни Альцгеймера, с использованием трансгенных мышей тау

Предыдущие исследования продемонстрировали значительное уменьшение патологии тау после введения Ta1505-mIgG2a с тенденцией к уменьшению патологии при увеличении дозы (см. WO 2018/254390). Цель этого исследования состояла в том, чтобы определить, могут ли муринизированные высокоаффинные антитела против тау-pS413 (например V8-AFM-mIgG1), которые показали 40-кратное увеличение активности связывания с экстрактами головного мозга AD P2 (0,013 нМ для AFM-mIgG1 по сравнению с 0,51 нМ для pTa1505, данные не представлены), уменьшать патологию тау при более низких дозах, чем исходное антитело. Модель посева *in vivo* использовали для оценки эффекта Ta1505-mIgG1 (40 мг/кг, 10 мг/кг, 5 мг/кг), V8-AFM-mIgG1 (40 мг/кг, 10 мг/кг, 5 мг/кг, 1 мг/кг) или изотипический контроль mIgG1 (40 мг/кг) на развитие тау-патологии. После лечения антителами мышам Tg4510 (WT:Car) вводили в гиппокамп препарат нерастворимого в саркозиде тау (SI) мышей rTg(tauP301L)4510 (Car:Car), чтобы вызвать передачу и патологию тау вокруг места инъекции и распространение в другие области головного мозга. Затем мышам еженедельно вводили инъекции антител. Через 30 дней после введения начальной дозы животных вскрывали, и ткани головного мозга окрашивали на гиперфосфорилированный тау в положениях аминокислот S202 и T205 (AT-8 при разведении 1:1500, выявляемый при хромогенном окрашивании). Патологию

тау оценивали в инъекционной области гиппокампа. Семь срезов гиппокампа каждого животного количественно определяли с помощью программного обеспечения Halo для определения % положительного окрашивания на площадь.

На **фиг. 5** показано уменьшение патологии при высоких дозах как V8-AFM-mIgG1, так и Ta1505-mIgG1, а также тенденция к уменьшению реакции на дозу при патологии тау в ипсилатеральном гиппокампе. В то время как введение V8-AFM-mIgG1 не показало значительно лучшего снижения патологии тау, воздействие препарата было неожиданно ниже в группах V8-AFM-mIgG1. В частности, для каждого уровня дозы группа V8-AFM-mIgG1 показала в 20 раз более низкие уровни РК, чем группа Ta1505-mIgG1 (**таблица 12**). В результате авторы не могли напрямую сравнивать эффективные дозы. Однако при дозе 40 мг/кг наблюдалось снижение патологии на 35% в группе V8-AFM-mIgG1 при уровнях в плазме ~300 нМ, тогда как снижение на 45% наблюдалось при в 20 раз более высоком воздействии Ta1505-mIgG1 в плазме (**таблица 13**), что указывает на повышенную активность высокоаффинного варианта V8-AFM-mIgG1.

Таблица 12. Концентрации в плазме и CSF для групп лечения mAb на 30 день

Название антитела	Доза (мг/кг)	Плазма (нМ)		CSF (нМ)		отношение CSF/плазма
		Среднее	SD	Среднее	SD	
V8-AFM-mIgG1	40	307,8	157,4	0,30	0,23	0,10%
V8-AFM-mIgG1	10	116,7	76,3	0,35	0,65	0,30%
V8-AFM-mIgG1	5	41,5	48,4	0,06	0,02	0,144%
V8-AFM-mIgG1	1	38,8	45,8	BLQ	BLQ	BLQ
Ta1505-mIgG1	40	6203	786,4	6,05	3,70	0,098%
Ta1505-mIgG1	10	1558	383,3	1,21	0,50	0,078%
Ta1505-mIgG1	5	1019	315,5	1,28	1,79	0,13%

Таблица 13. Процент снижения тау-патологии

Лечение (антитело, доза)	Процент снижения по сравнению с контролем mIgG1
V8-AFM-mIgG1, 40 мг/кг	35%
V8-AFM-mIgG1, 10 мг/кг	22%
V8-AFM-mIgG1, 5 мг/кг	16%
V8-AFM-mIgG1, 1 мг/кг	14%
Ta1505-mIgG1, 40 мг/кг	45%
Ta1505-mIgG1, 10 мг/кг	20%
Ta1505-mIgG1, 5 мг/кг	-2%

Пример 8. Обнаружение ex-vivo взаимодействия с мишенью антитела против тау-pS413 в образцах CSF здоровых добровольцев и пациентов с AD

Сверхчувствительный электрохемилюминесцентный анализ (ECL) на платформе Meso Scale Discovery S-Plex был разработан для измерения исходного уровня тау-pS413 в CSF человека и свободного (то есть несвязанного) тау-pS413 в присутствии специфических к тау-pS413 антител. Этот метод можно использовать для демонстрации захвата мишени антителами против тау-pS413 в виде уменьшения сигнала свободного тау-pS413. В этом сэндвич-иммуноанализе биотинилированные мышинные моноклональные антитела Ta1505 против тау-pS413 наносили на 96-луночные планшеты MSD S-PLEX SECTOR (Mesoscale Discovery, cat No. L45SA) в концентрации 1 мкг/мл с S-PLEX Coating Reagent C1 (Mesoscale Discovery Cat No C20H0). Образцы CSF разбавляли 1:2 в Diluent 100 (Mesoscale Discovery, cat# R50AA) с 0,12 мг/мл гетерофильного S блокирующего реагента 1 (Scantibodies Cat No 3KC534-075). После промывки планшета с покрытием 1x PBST в каждую лунку загружали 75 мкл образцов в дополнение к 75 мл разбавителя 100 с 1x блокирующим реагентом S-PLEX S1 (Mesoscale Discovery Cat No R93AG). Образцы инкубировали в течение ночи при 4°C на орбитальном шейкере (700 об/мин). После этапов промывки в каждую лунку добавляли детектирующее антитело Ta1505 с меткой Turbo Boost в концентрации 0,2 мкг/мл в разбавителе MSD 101 (Mesoscale Discovery Cat No. R51AD) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на орбитальном шейкере (700 об/мин). Этапы проявления и усиления цвета выполняли в соответствии с протоколом MSD S-PLEX. Планшеты считывали на приборе MESO SECTOR™ S600 по электрохемилюминесцентному сигналу (A.U.).

Связывание ex-vivo антител против тау-pS413 оценивали путем количественного определения тау-pS413 после инкубации образцов CSF человека без AD или с AD с V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE в титрованных концентрациях (от 0,085 фМ до 50 нМ) с использованием анализа tau-pS413 MSD S-PLEX. Сигнал анализа уменьшался с увеличением концентрации V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE (**фиг. 7А**). Антитело достигало 100% занятости мишени при концентрации от примерно 1,85 нМ до примерно 50 нМ. Процентное снижение уровней свободного тау-pS413 (не связанного V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE) рассчитывали на основе максимального сигнала, получаемого без V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE, и минимального сигнала, получаемого без 50 нМ V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE (из максимального уровня и минимального уровня вычитали фоновый уровень без образцов CSF, но только с буфером). Нелинейная регрессия концентрации в процентах снижения позволяет определить активность ex-vivo V8-AFM-hIgG1-LALA-YTE, $IC_{50}=0,0169$ нМ (доверительный интервал 95% от 0,0141 до 0,0204 нМ) в CSF пациентов с AD (**фиг.7В**). Из-за низкого исходного сигнала тау-pS413 и узкого окна снижения в образцах CSF без AD $IC_{50}=0,101$ нМ в CSF пациентов без AD имел больший 95% доверительный интервал (от 0,045 до 0,243 нМ).

Все ссылки, приведенные в данном документе, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, запись в базе данных (например последовательности GenBank или записи GeneID), заявка на патент или патент были специально и отдельно указаны для включения в качестве ссылки. Это заявление о

включении посредством ссылки предназначено Заявителями в соответствии с 37 CFR §1.57(b)(1) для связи с каждой отдельной публикацией, записью в базе данных (например последовательностями GenBank или записью GeneID), заявкой на патент или патентом, каждое из которых четко обозначено в соответствии с 37 CFR §1.57(b)(2), даже если такое цитирование не находится непосредственно рядом со специальным заявлением о включении посредством ссылки. Включение в описание специальных заявлений о включении посредством ссылки, если таковые имеются, никоим образом не ослабляет это общее заявление о включении посредством ссылки. Цитирование ссылок в данном документе не означает признание того, что ссылка относится к известному уровню техники, а также не является признанием содержания или даты этих публикаций или документов.

Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые описаны в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области из приведенного выше описания и прилагаемых фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Приведенное выше письменное описание считается достаточным для того, чтобы специалист в данной области мог использовать изобретение на практике. Различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые показаны и описаны в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области из предшествующего описания и подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

Список Последовательностей

Настоящее описание подано вместе с копией списка последовательностей в машиночитаемой форме (CRF). CRF под названием 24996WOPCT-SEQTXT-13MAY2021-ST25.txt, созданный 13 мая 2021 г. и имеющий размер 113 797 байт, идентичен бумажной копии списка последовательностей и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. В **таблице 14** ниже приведены все последовательности, раскрытые в описании.

Таблица 14. Последовательности, раскрытые в описании

SEQ ID NO	Описание последовательности	Последовательность (SEQ ID NO:107 и 108 представляют собой нуклеотидные последовательности, остальные представляют собой аминокислотные последовательности)
1	Тау человека изоформа 4R2N	MAEPRQEFVMEHDAGTYGLGDRKDQGGYTMH QDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSEEPGSETSDA KSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTIEPEG TTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDG TGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQAN

		ATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSP GTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSA KSRLQTAPVPM PDLKNV KSKIGSTENLKHQPGGG KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQI VYK PVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE KLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNV SSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL
2	Тау человека изоформа 4R1N	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMH QDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSEEPGSETSDA KSTPTAEAE EAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS KSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQ KGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGY SSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPP KSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNV KSKIGSTENLKH QPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPG GGSVQIVYK PVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQ VEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKI ETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSP RHLSNV SSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQ GL
3	Тау человека изоформа 4R0N	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMH QDQEGD TDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ ARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGA APPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSG DRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAV VRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNV KSKIGST ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNI KHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVTSKCGSLGNIHHK PGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPG GGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVV SGDTSPRHLSNV SSTGSIDMVDSPQLATLADEVSA SLAKQGL
4	Тау человека изоформа 3R2N	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMH QDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSEEPGSETSDA

		KSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEG TTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDG TGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQAN ATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSP GTPGSRSRTPSLTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSA KSRLQTAPVMPDLKNVSKSKIGSTENLKHQPGGG KVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVE VKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIET HKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL LSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL
5	Тау человека изоформа 3R1N	MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMH QDQEGDTDAGLKESPLQPTEDGSEEPGSETSDA KSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS KSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQ KGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGY SSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREPKKVAVVRTPP KSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKSKIGSTENLKH QPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPG GGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGG NKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSG DTSRHLNSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASL AKQGL
6	Тау человека изоформа 3R0N	MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMH QDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQ ARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGA APPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSG DRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREPKKVAV VRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKSKIGST ENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNI HHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITH VPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKS PVVSGDTSRHLNSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLADE VSASLAKQGL
7	Ta1505, VL-CDR1	RSSQNIVHSNGNTYLE
8	Ta1505, VL-CDR2	TVSNRFS

9	Ta1505, VL-CDR3	FQGSHLPLT
10	Ta1505, VL	DILMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNIVHSNGNT YLEWYLQKPGQSPKVLIIYTVSNRFSGV PDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGG GTKLELK
11	Ta1505, легкая цепь	DILMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNIVHSNGNT YLEWYLQKPGQSPKVLIIYTVSNRFSGV PDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGG GTKLELK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VCF LNNFY PKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTS PIVKSFNRNEC
12	Ta1505, VH-CDR1	SFALN
13	Ta1505, VH-CDR2	HIRSKTN NYATFYADSVKD
14	Ta1505, VH-CDR3	RGPRDSWFGY
15	Ta1505, VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLS CAASGFAFNSFAL NWVRQAPGKSLEWVVHIRSKTN NYATFYADSVK DRFTVSRDDSQSMVYLQMNNLKTEDTGIYYCVR RGPRDSWFGYWGQGT LVTLSA
16	Ta1505, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLS CAASGFAFNSFAL NWVRQAPGKSLEWVVHIRSKTN NYATFYADSVK DRFTVSRDDSQSMVYLQMNNLKTEDTGIYYCVR RGPRDSWFGYWGQGT LVTLSAAKT TAPSVYPLA PVC GDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSL SSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNL LGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLPIVTCVVVDVSEDD PDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS ALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKP KGSVRAPQVYVLP PPEEEMTKKQVTLTCMV TDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYF MYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTT KSFSRTPGK
17	VL46, VL-CDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE

18	VL46, VL-CDR2	TVSNRFS
19	VL46, VL-CDR3	FQGSHLPLT
20	VL46, VL	DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQSIVHSNGNT YLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGG TKVEIK
21	VH11, VH-CDR1	SFALN
22	VH11, VH-CDR2	HIRSKTNNYATFYAASVKD
23	VH11, VH-CDR3	RGPRDSWFGY
24	VH11, VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFALN WVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKD RFTVSRDDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRR GPRDSWFGYWGQGTLLVTVSS
25	VL46_G34A_S28N, VL-CDR1	RSSQNIVHSNANTYLE
26	VL46_G34A_S28N, VL-CDR2	TVSNRFS
27	VL46_G34A_S28N, VL-CDR3	FQGSHLPLT
28	VL46_G34A_S28N, VL	DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQNIVHSNANT YLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGG TKVEIK
29	VL46_G34A_S28N_Q27 R_S32R_H98Y, VL-CDR1	RSSRNIVHRNANTYLE
30	VL46_G34A_S28N_Q27 R_S32R_H98Y, VL-CDR2	TVSNRFS
31	VL46_G34A_S28N_Q27 R_S32R_H98Y, VL-CDR3	FQGSYLPLT
32	VL46_G34A_S28N_Q27 R_S32R_H98Y, VL	DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSRNIVHRNANT YLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSG

		SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSYLPLTFGGG TKVEIK
33	VL46_G34A_S28K_S32 R_H98Y, VL-CDR1	RSSQKIVHRNANTYLE
34	VL46_G34A_S28K_S32 R_H98Y, VL-CDR2	TVSNRFS
35	VL46_G34A_S28K_S32 R_H98Y, VL-CDR3	FQGSYLPLT
36	VL46_G34A_S28K_S32 R_H98Y, VL	DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQKIVHRNANT YLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSYLPLTFGGG TKVEIK
37	VL46_G34A_S28N_Q27 H_S32R_H98Y, VL- CDR1	RSSHNIVHRNANTYLE
38	VL46_G34A_S28N_Q27 H_S32R_H98Y, VL- CDR2	TVSNRFS
39	VL46_G34A_S28N_Q27 H_S32R_H98Y, VL- CDR3	FQGSYLPLT
40	VL46_G34A_S28N_Q27 H_S32R_H98Y, VL	DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSHNIVHRNANT YLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSYLPLTFGGG TKVEIK
41	VH11_D68G, VH-CDR1	SFALN
42	VH11_D68G, VH-CDR2	HIRSKTNNYATFYAASVKG
43	VH11_D68G, VH-CDR3	RGPRDSWFGY
44	VH11_D68G, VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFALN WVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKG RFTVSRDDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRR GPRDSWFGYWGQGTLVTVSS
45	VH11_A59V_D68G, VH-CDR1	SFALN

46	VH11_A59V_D68G, VH-CDR2	HIRSKTNNYVTFYAASVKG
47	VH11_A59V_D68G, VH-CDR3	RGPRDSWFGY
48	VH11_A59V_D68G, VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFALN WVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYVTFYAASVKG RFTVSRDDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRR GPRDSWFGYWGQGTLLTVSS
49	VH11_K54E_D68G, VH-CDR1	SFALN
50	VH11_K54E_D68G, VH-CDR2	HIRSETNNYATFYAASVKG
51	VH11_K54E_D68G, VH-CDR3	RGPRDSWFGY
52	VH11_K54E_D68G, VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFALN WVRQAPGKGLEWVGHIRSETNNYATFYAASVKG RFTVSRDDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRR GPRDSWFGYWGQGTLLTVSS
53	VH11_K54E_A59V_D6 8G, VH-CDR1	SFALN
54	VH11_K54E_A59V_D6 8G, VH-CDR2	HIRSETNNYVTFYAASVKG
55	VH11_K54E_A59V_D6 8G, VH-CDR3	RGPRDSWFGY
56	VH11_K54E_A59V_D6 8G, VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFALN WVRQAPGKGLEWVGHIRSETNNYVTFYAASVKG RFTVSRDDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRR GPRDSWFGYWGQGTLLTVSS
57	Легкая цепь лямбда человека, константная область	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVA PTECS
58	Легкая цепь каппа	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR

	человека, константная область	EAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
59	Человеческий_IgG1 тяжелая цепь, константная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
60	Человеческий_IgG1_L ALA, константная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	Человеческий_IgG1_ LALA_D265S, константная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVsVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
62	Человеческий_IgG1_Y TE, константная	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

	область	TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLyItReP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
63	Человеческий_IgG1_L ALA_YTE, константная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAEEaGGPSVFLFPPKPKDTLyItRePE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
64	Человеческий_IgG1_N2 97A, константная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65	Человеческий_IgG1_N2 97Q, константная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYqSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

		TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66	Человеческий_IgG2, константная область	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTV VERKCC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV T CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVS VLT TVVH QDWLNGKEYKCKVSNK GLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPP MJDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
67	Человеческий_IgG4, константная область	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVS VLT TVLH QDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGLK
68	Человеческий_IgG4_S2 28P, константная область	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVS VLT TVLH QDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGLK
69	VL46_G34A_S28N_кап па легкая цепь	DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQNIVHSNANT YLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVPPDRFSGSG

		SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGG TKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
70	VH11_IgG4-S228P тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFALN WVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKD RFTVSRDDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRR GPRDSWFGYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK
71	V8-AFM-hIgG1 LALA, легкая цепь	DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQKIVHRNANT YLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSYLPLTFGGG TKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
72	V8-AFM-hIgG1 LALA, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFALN WVRQAPGKGLEWVGHIRSETNNYVTFYAASVKG RFTVSRDDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRR GPRDSWFGYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEaa GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV

		SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK LSLSPGK
73	V8-AFM-hIgG1 LALA YTE, легкая цепь	DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQKIVHRNANT YLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSYLPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
74	V8-AFM-hIgG1 LALA YTE, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFALN WVRQAPGKGLEWVGHIRSETNNYVTFYAASVKG RFTVSRDDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRR GPRDSWFGYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEaa GGPSVFLFPPKPKDTL _Y ItRePEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
75	V8-AFM-hIgG4, легкая цепь	DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQKIVHRNANT YLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSYLPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
76	V8-AFM-hIgG4, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFALN WVRQAPGKGLEWVGHIRSETNNYVTFYAASVKG

		RFTVSRDDSQNTAYLQMNSLKTEDTATYYCVRR GPRDSWFGYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCN VDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK
77	PD17(P)	PRHLSNVS(pS)TGSIDMVD
78	PD17	PRHLSNVSSTGSIDMVD
79	T-pS396/400/404GC	GCRENAKAKTDHGAEIVYK(pS)PVV(pS)GDT(pS)P RHL
80	T-pT212pS214GC	GCGSPGTPGSRSR(pT)P(pS)LPTPPTREPK
81	pSer412Cys	NV(pS)STGSC
82	T-pT217GC	GCGSRSRTPSLP(pT)PPTREPKKVAVV
83	VL-CDR1, AbM	RSSQKIVHRNANTYLE
84	VL-CDR2, AbM	TVSNRFS
85	VL-CDR3, AbM	FQGSYLPLT
86	VH-CDR1, AbM	GFTFSSFALN
87	VH-CDR2, AbM	HIRSETNNYVTF
88	VH-CDR3, AbM	RGPRDSWFGY
89	VL-CDR1, Chothia	RSSQKIVHRNANTYLE
90	VL-CDR2, Chothia	TVSNRFS
91	VL-CDR3, Chothia	FQGSYLPLT
92	VH-CDR1, Chothia	GFTFSSF
93	VH-CDR2, Chothia	RSETNNYV
94	VH-CDR3, Chothia	RGPRDSWFGY
95	VL-CDR1, Contact	VHRNANTYLEWY
96	VL-CDR2, Contact	LLIYTVSNRF
97	VL-CDR3, Contact	FQGSYLPL

98	VH-CDR1, Contact	SSFALN
99	VH-CDR2, Contact	WVGHIRSETNNYVTF
100	VH-CDR3, Contact	VRRGPRDSWFG
101	VL-CDR1, IMGT	QKIVHRNANTY
102	VL-CDR2, IMGT	TV
103	VL-CDR3, IMGT	FQGSYLPLT
104	VH-CDR1, IMGT	GFTFSSFA
105	VH-CDR2, IMGT	IRSETNNYV
106	VH-CDR3, IMGT	VRRGPRDSWFGY
107	ДНК, кодирующая легкую цепь	atgtccgtgcctacacaggttctgggactgctgctgtgtggctgaccgacgc cagatgcgacatcgtgatgaccagctctccactgagcctgcctgtgacactgg gagagccagcctccatctcctgccggtcctctcagaaaatcgtgcaccggaac gccaacacctacctggaatggtatctgcagaagccccggccagctctcctcagct gctgatctacaccgtgtccaaccggttctctggcgtgcccgatagattctcgg ctctggctctggcaccgacttcacctgaagatctccagagtggagccgagg acctgggcgtgtactactgctccaaggctcctacctgcctctgacctttggcgg cggaacaaaggtggaatcaagcggacagtggccgctccttccgtgttcatct tcccacctccgacgagcagctgaagtccggcacagcttctgtcgtgtgctg ctgaacaacttctacctcgggaagccaaggtgcagtggaggtggacaatg ccctgcagtccggcaactcccaagagtctgtgaccgagcaggactccaagga cagcacctacagcctgtcctccacactgacctgtccaaggccgactacgag aagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgacctatcagggcctgtctagccctgt gaccaagtcttcaaccggggcgagtgt
108	ДНК, кодирующая тяжелую цепь	atggaatggctcctgggtgttctgttcttctgtccgtgaccaccggcgtgact ctgaagtgcagctgggtgaatctggcggcggattggtcagcctggcggatct ctgagactgtctgtgccgctccggcttcaccttctctagcttcgctctgaactg ggtcgcagaggtcctggcaaaggactggaatgggtcggacacatcagatcc gagacaaacaactacgtgaccttctacgccgccagcgtgaagggcagattca ccgtgtccagagatgactcccagaacaccgcctacctgcagatgaactccctg aaaaccgaggacaccgccactactactgcgtgcgaagaggccctcgggac agttggctcgatattggggacagggcaccctcgtgaccgtgtcctctgcttcta ccaagggaccagcgtgttccctctggctccttccagcaagtctacctctggcg gaacagctgctctgggctgcctggtaaggactacttctctgagcctgtgacag tgtcttggaaactctggcgtctgacatctggcgtgcacaccttccagctgtgct

		gcagtcctccggcctgtactctctgtcctctgtcgtgacagtgccctccagctct ctgggaaccagacctacatctgcaatgtgaaccacaagcctccaacaccaa ggtggacaagaagggtggaaccaagtcctgcgacaagaccacacctgtcct ccatgtcctgtctccagaagctgtggtggccctccgtgtttctgttcctccaa agcctaaggacacctgtacatcacccgcgagcctgaagtgacctgcgtggt ggtggatgtgtctcacgaggaccccgaagtgaagtcaattggtacgtggacg gctggaagtgcacaacgccaaagaccaagcctagagaggaacagtacaact ccacctacagagtgggtgtccgtgtgacctgtgtgcaccaggattggctgaac ggcaaagagtacaagtgaagggtgtccaacaaggccctgcctgtcctatcg aaaagaccatctccaaggccaagggccagcctagggaaccccagggtttaca ccttgccctccatctcgggacgagctgaccaagaaccagggtgtccctgacctgc ctcgtgaagggtattctaccctccgatatgccgtggaatgggagtctaattggc cagcctgagaacaactacaagacaacccctcctgtgtgactccgacgget cattctttctgtactccaagctgacagtggacaagtccagatggcagcagggc aacgtgttctcctgcagcgtgatgcacgagggcctgcacaatcactacacca gaagtcctgtctctgtccctggcaaa
109	Пептид	GAEIVYK(pS)PVVSGDT(pS)PRHLSNVs(pS)TGSID MVD(pS)PQLATLADEVsASLAKQGL

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с таурS413, содержащие:

(а) определяющую комплементарность область 1 вариабельной области тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41; определяющую комплементарность область 2 вариабельной области тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; и определяющую комплементарность область 3 вариабельной области тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и

определяющую комплементарность область 1 вариабельной области легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29; определяющую комплементарность область 2 вариабельной области легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30; и определяющую комплементарность область 3 вариабельной области легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31;

(b) VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и

VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35;

(c) VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и

VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39;

(d) VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и

VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27;

(e) VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43; и

VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19;

(f) VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45;

VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:100; и

VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:96; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97; или

(aa) VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:106; и

VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-рS413, содержащие:

(a) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 переменной области легкой цепи (VL), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32;

(b) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36;

(c) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40;

(d) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28;

(e) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20;

(f) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32;

(g) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:36;

(r) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40;

(s) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28;

(t) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20;

(u) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32;

(v) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; или

(w) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24; и

VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, содержащие:

(a) VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:44, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:32;

(b) VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:44, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36;

(c) VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:44, и VL, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:40;

(d) VH, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:44, и VL, имеющую

- [illegible]

(u) VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32;

(v) VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; или

(w) VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, дополнительно содержащие:

(a) константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68; и

(b) константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57 или 58.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащий VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53; VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54; и VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; и

VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, содержащий VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; и VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56 и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36.

9. Антитело, содержащее:

(a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72;

(b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74; или

(c) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76.

10. Антитело, состоящее из:

(a) двух легких цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и двух тяжелых цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72;

(b) двух легких цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и двух тяжелых цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74; или

(с) двух легких цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и двух тяжелых цепей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76.

11. Антитело, состоящее из:

(а) двух легких цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:71, и двух тяжелых цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:72;

(b) двух легких цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:73, и двух тяжелых цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:74; или

(с) двух легких цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:75, и двух тяжелых цепей, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:76.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, имеющие равновесную константу диссоциации (KD) 1×10^{-8} М или менее, 9×10^{-9} М или менее, 8×10^{-9} М или менее, 7×10^{-9} М или менее, 6×10^{-9} М или менее, 5×10^{-9} М или менее, 4×10^{-9} М или менее, 3×10^{-9} М или менее или 2×10^{-9} М или менее для тау-pS413.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, имеющие KD 2×10^{-9} М или менее для тау-pS413.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12 или 13, где KD измеряют с помощью Biacore с иммобилизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

15. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая:

(а) VH антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14;

(b) VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14;

(с) VH и VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14;

(d) тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14;

(е) легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14; или

(f) тяжелую цепь и легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14.

16. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 15.

17. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 15 или вектор экспрессии по п. 16.

18. Способ получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, включающий:

(а) культивирование клетки-хозяина по п. 17;

(b) экспрессию вектора экспрессии по п. 16; или

(с) экспрессию выделенной нуклеиновой кислоты по п. 15, в условиях экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

19. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14.

21. Способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14 или композиции по п. 19.

22. Способ по п. 21, где таупатия представляет собой такие заболевания, как болезнь Альцгеймера, кортикобазальная дегенерация, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Пика, деменция с агриофильной зернистостью (заболевание с агриофильной зернистостью), множественная системная таупатия с пресенильной деменцией (MSTD), лобно-височная деменция и паркинсонизм, сцепленные с хромосомой 17 (FTDP-17), деменция с нейрофибриллярными клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцинозом (DNTC), таупатия белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI), лобно-височная долевая дегенерация с патологией тау (FTLD-тау), последствия энцефалита Экономо, подострый склерозирующий панэнцефалит или энцефалопатия боксеров.

23. Способ уменьшения количества тау-pS413 в головном мозге субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14 или композиции по п. 19.

24. Способ по п. 21 или 23, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного средства.

25. Композиция по п. 19, дополнительно содержащая дополнительное средство.

26. Способ по п. 24 или композиция по п. 25, где дополнительное средство выбирают из группы, состоящей из ингибиторов холинэстеразы, донепезила, галантамина, ровастигмина, такрина, антагонистов рецепторов HMDA, мемантина, ингибиторов агрегации бета-амилоидных пептидов, антиоксидантов, модуляторов гамма-секретазы, имитаторов фактора роста нервов (NGF) или генной терапии NGF, агонистов PPAR γ , ингибиторов HMS-CoA-редуктазы, статинов, ампакинов, блокаторов кальциевых каналов, антагонистов рецепторов GABA, ингибиторов киназы гликогенсинтазы, внутривенного иммуноглобулина, агонистов мускариновых рецепторов, модуляторов никотиновых рецепторов, активного или пассивного бета-амилоидного пептида для иммунизации, ингибиторов фосфодиэстеразы, антагонистов серотониновых рецепторов, антител против бета-амилоидного пептида, гормона роста, нейротрофического фактора, нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), фактора роста нервов (NGF), нейротрофина-4/5, фактора роста фибробластов (FGF)-2 и других FGF, нейротрофина (NT)-3, эритропоэтина (EPO), фактора роста гепатоцитов (HGF), эпидермального фактора

роста (EGF), трансформирующего фактора роста (TGF)- α , TGF-бета, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), глиального нейротрофического фактора (GDNF), нейтрина, тромбоцитарного фактора роста (PDGF), херегулина, нейрегулина, артемина, персефина, интерлейкинов, нейротрофического фактора глиальной клеточной линии (GFR), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (CSF), гранулоцитарно-макрофагального CSF, нетринов, кардиотрофина-1, белков hedgehog, фактора ингибирования лейкемии (LIF), мидкина, плейотрофина, костных морфогенетических белков (BMP), нетринов, сапозинов, семафоринов, фактора стволовых клеток (SCF) или другого антитела против тау или их комбинации.

27. Применение антител или их антигенсвязывающих фрагментов по любому из пп. 1-14 для лечения таупатии у субъекта.

28. Применение антител или их антигенсвязывающих фрагментов по любому из пп. 1-14 для лечения таупатии у субъекта.

29. Применение антител или их антигенсвязывающих фрагментов по любому из пп. 1-14 для получения лекарственного средства для лечения таупатии у субъекта.

30. Применение по любому из пп. 27-29, где таупатия представляет собой такие заболевания, как болезнь Альцгеймера, кортикобазальная дегенерация, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Пика, деменция с агрирофильной зернистостью (заболевание с агрирофильной зернистостью), множественная системная таупатия с пресенильной деменцией (MSTD), лобно-височная деменция и паркинсонизм, сцепленные с хромосомой 17 (FTDP-17), деменция с нейрофибриллярными клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцинозом (DNLC), таупатия белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI), лобно-височная долевая дегенерация с патологией тау (FTLD-тау), последствия энцефалита Экономо, подострый склерозирующий панэнцефалит или энцефалопатия боксеров.

31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14 для применения в способе лечения таупатии у субъекта.

32. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14 для применения в способе диагностики таупатии у субъекта.

33. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 31 или 32, где таупатия представляет собой такие заболевания, как болезнь Альцгеймера, кортикобазальная дегенерация, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Пика, деменция с агрирофильной зернистостью (заболевание с агрирофильной зернистостью), множественная системная таупатия с пресенильной деменцией (MSTD), лобно-височная деменция и паркинсонизм, сцепленные с хромосомой 17 (FTDP-17), деменция с нейрофибриллярными клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцинозом (DNLC), таупатия белого вещества с глобулярными глиальными включениями (WMT-GGI), лобно-височная долевая дегенерация с патологией тау (FTLD-тау), последствия энцефалита Экономо, подострый склерозирующий панэнцефалит или энцефалопатия

боксеров.

ФИГ.1А

Консенсусная
последовательность

Идентичность

- 1. VH11
- 2. VH11_A59V_D68G
- 3. VH11_D68G_K54E
- 4. VH11_D68G
- 5. VH11_A59V_D68G_K54E
- 6. Та1505 VH

										CDRH1										CDRH2									
1	10	20	30		40	50	60	70	80																				
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFALNIVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKGRFTVSRDDSQNTAYL																													
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFALNIVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKDRFTVSRDDSQNTAYL																													
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFALNIVRQAPGKGLEWVGHIRSETNNYATFYAASVKGRFTVSRDDSQNTAYL																													
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFALNIVRQAPGKGLEWVGHIRSKTNNYATFYAASVKGRFTVSRDDSQNTAYL																													
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFALNIVRQAPGKGLEWVGHIRSETNNYVTFYAASVKGRFTVSRDDSQNTAYL																													
EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFAFNSFALNIVRQAPGKSLEWVGHIRSKTNNYATFYADSVKDRFTVSRDDSQSMVYL																													

Консенсусная
последовательность

Идентичность

- 1. VH11
- 2. VH11_A59V_D68G
- 3. VH11_D68G_K54E
- 4. VH11_D68G
- 5. VH11_A59V_D68G_K54E
- 6. Та1505 VH

										CDRH3									
90	100	110	121																
QMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSWFGYWGQGLTVTVSS																			
QMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSWFGYWGQGLTVTVSS																			
QMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSWFGYWGQGLTVTVSS																			
QMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSWFGYWGQGLTVTVSS																			
QMNSLKTEDTATYYCVRRGPRDSWFGYWGQGLTVTVSS																			
QMNNLKTEDTGIIYCVRRGPRDSWFGYWGQGLTVTVSA																			

ФИГ.1В

Консенсусная
последовательность

Идентичность

- 1. VL46_G34A_S28N
- 2. VL46_G34A_S28N_Q27H_S32R_H98Y
- 3. VL46_G34A_S28N_Q27R_S32R_H98Y
- 4. VL46
- 5. VL46_G34A_S28K_S32R_H98Y
- 6. Ta1505 VL

CDRL1																										CDRL2																																															
1	10									20									30											40											50											60											70										
DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQNI VHXNANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT																																																																									
DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQNI VHSNANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT																																																																									
DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSHNI VHRNANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT																																																																									
DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSRN I VHRNANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT																																																																									
DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT																																																																									
DIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQKI VHRNANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT																																																																									
DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKVLIIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT																																																																									

Консенсусная
последовательность

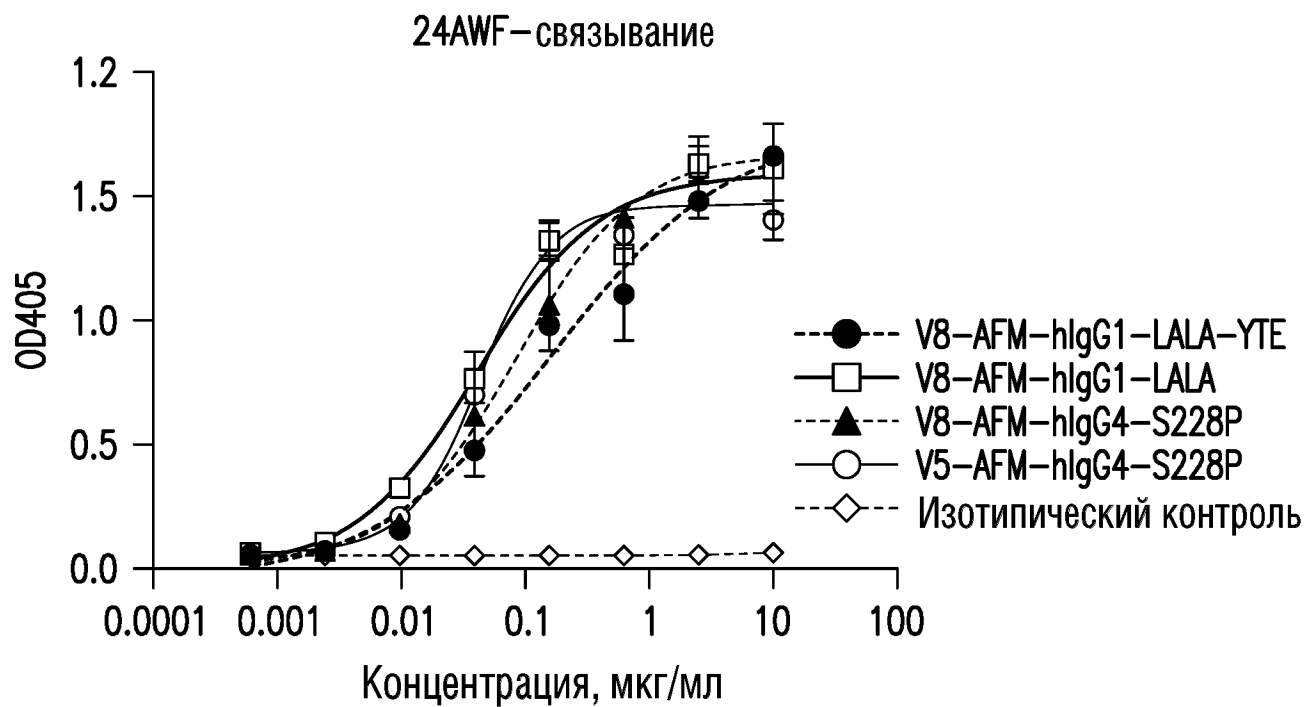
Идентичность

- 1. VL46_G34A_S28N
- 2. VL46_G34A_S28N_Q27H_S32R_H98Y
- 3. VL46_G34A_S28N_Q27R_S32R_H98Y
- 4. VL46
- 5. VL46_G34A_S28K_S32R_H98Y
- 6. Ta1505 VL

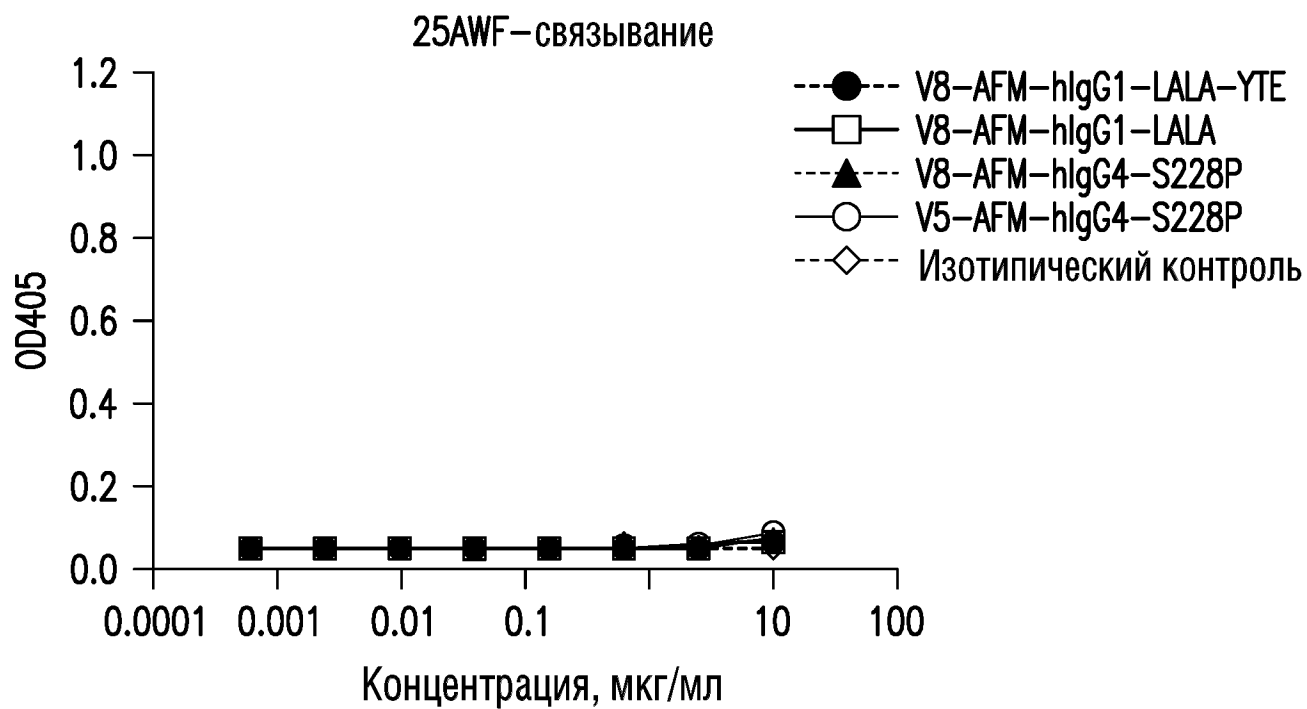
80	90	100	110	112										
LKISRVEAEDLGVYYCFQGSXLPLTFGGGTKVEIK														
IDLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHLPLTFGGGTKVEIK														
IDLKISRVEAEDLGVYYCFQGSYLPLTFGGGTKVEIK														
IDLKISRVEAEDLGVYYCFQGSYLPLTFGGGTKVEIK														
IDLKISRVEAEDLGVYYCFQGSYLPLTFGGGTKVEIK														
IDLKISRVEAEDLGVYYCFQGSYLPLTFGGGTKVEIK														
IDLKISRVEAEDLGVYYCFQGSYLPLTFGGGTKLELK														

CDRL3

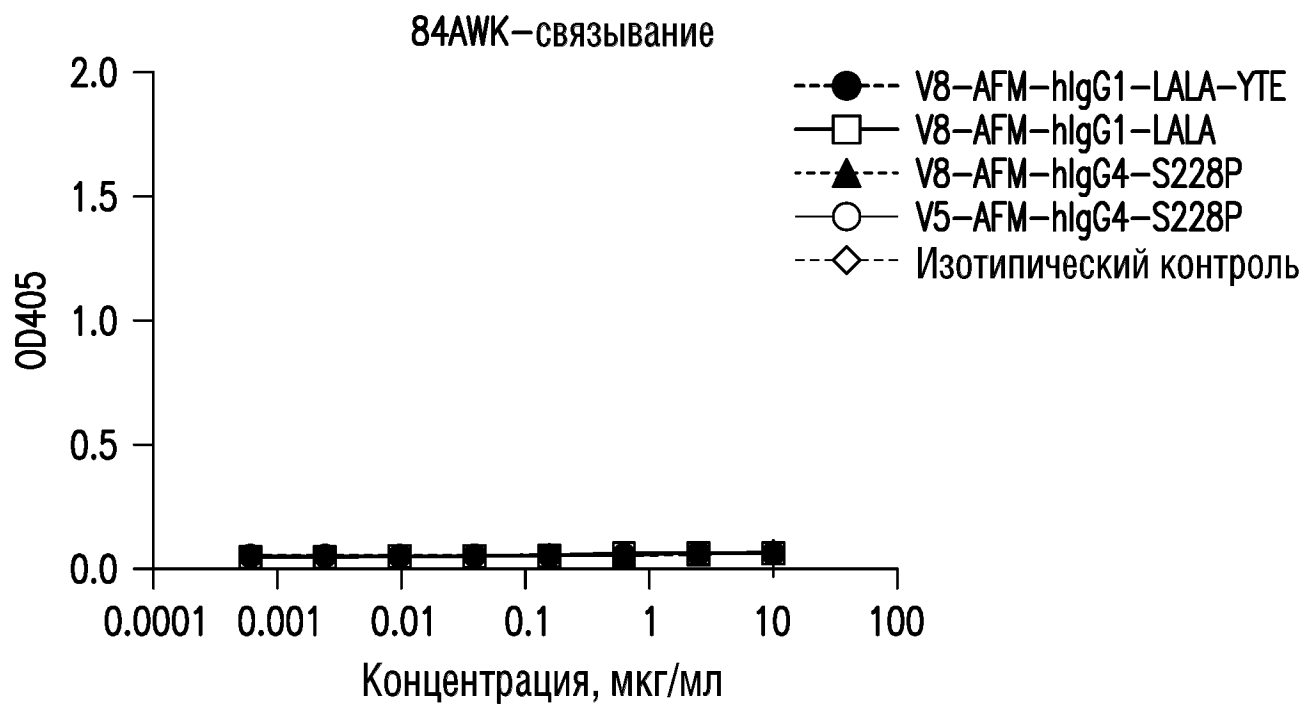
ФИГ.2А



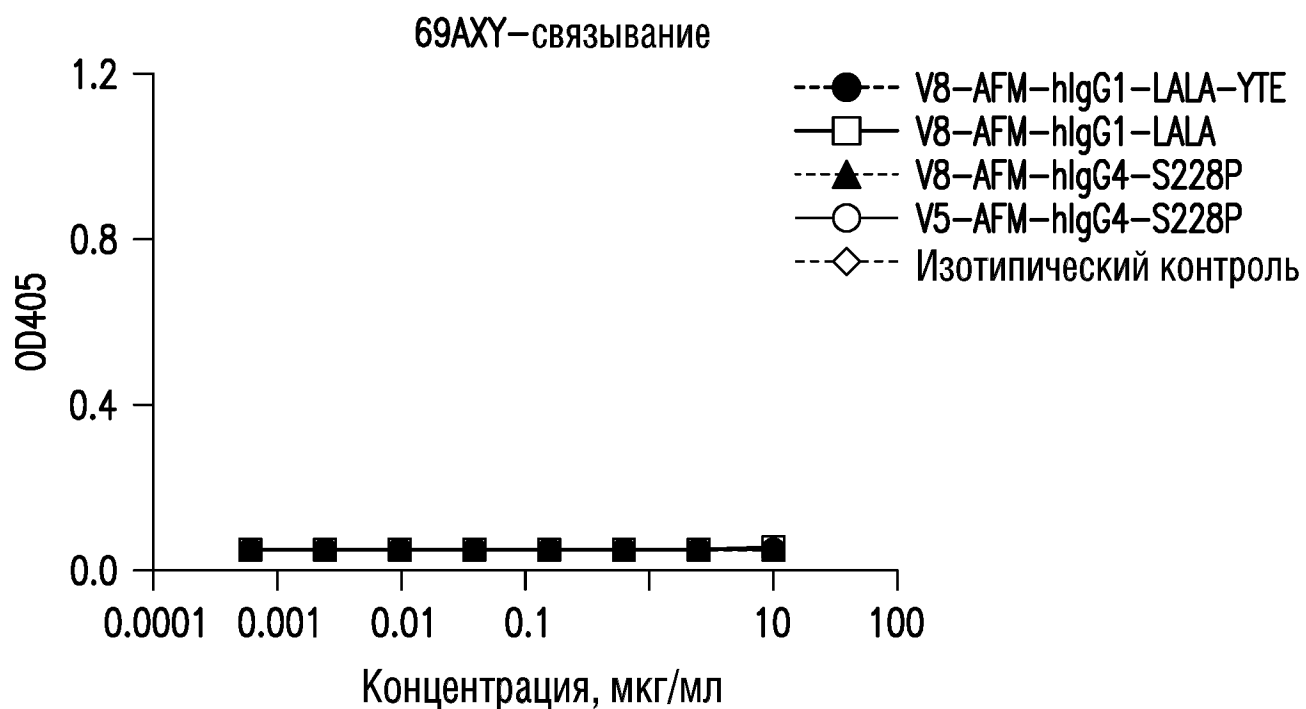
ФИГ.2В



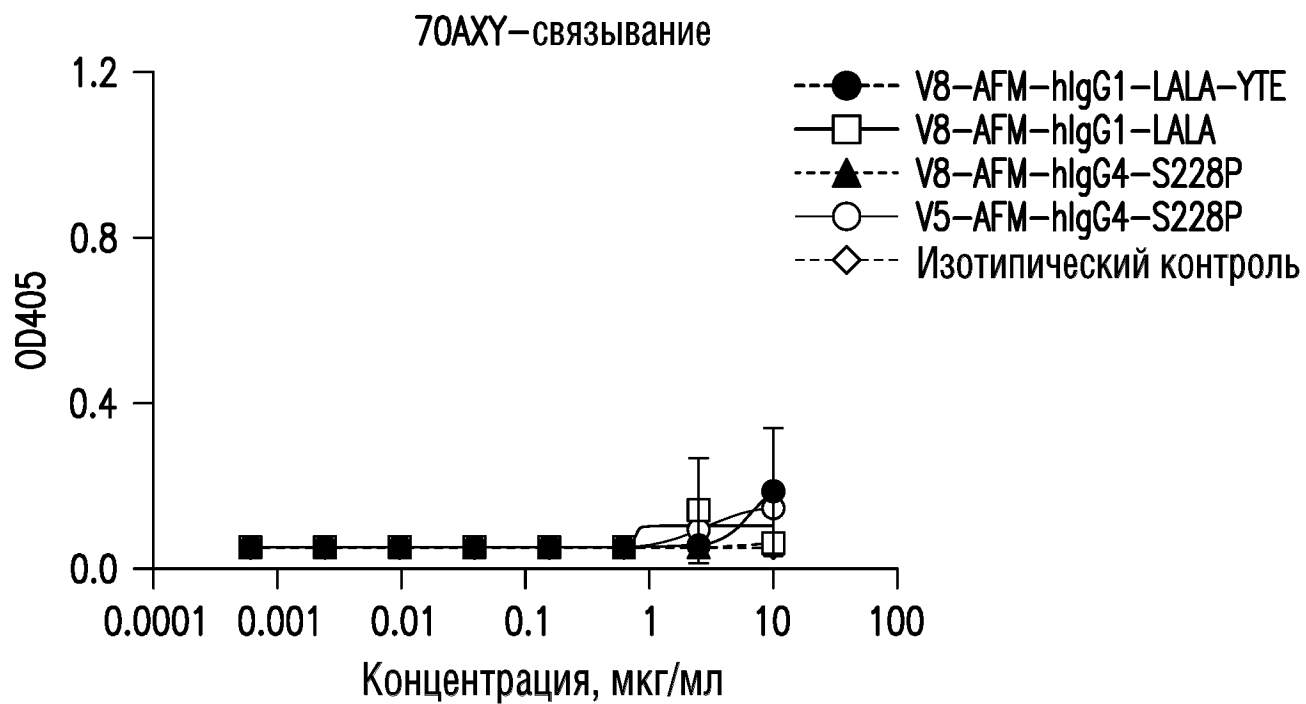
ФИГ.2С



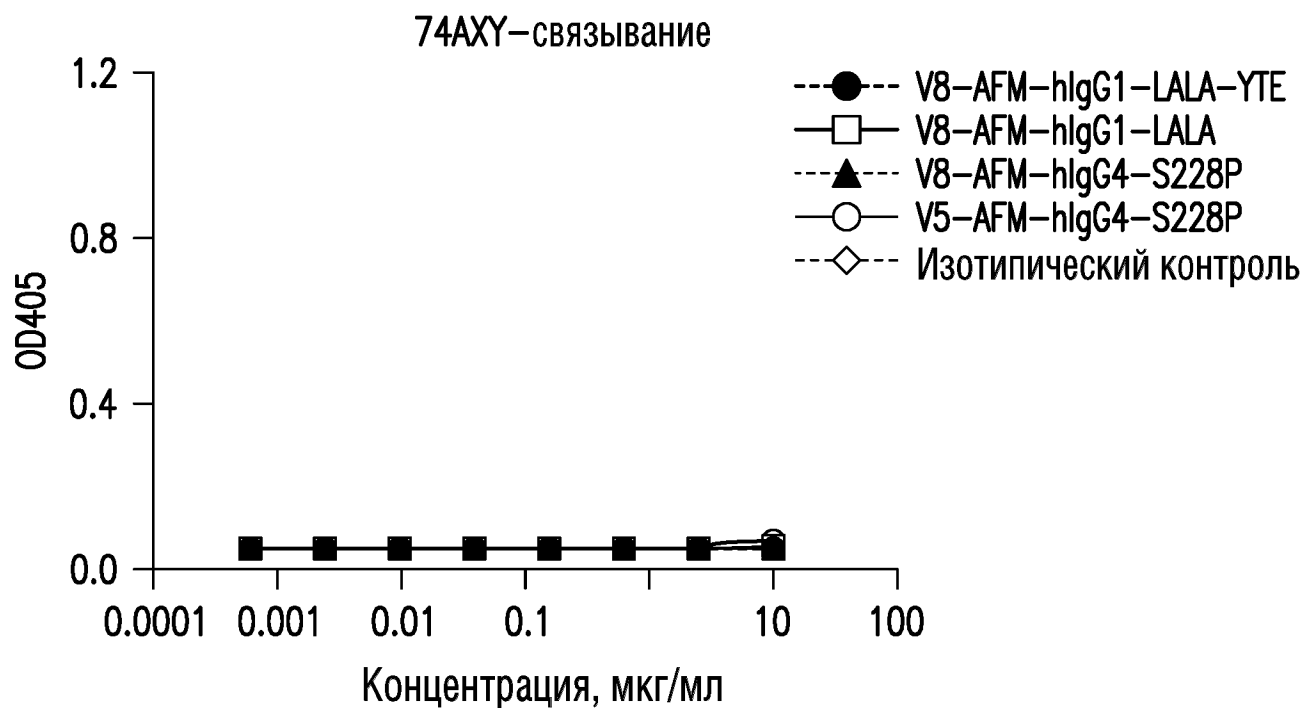
ФИГ.2D



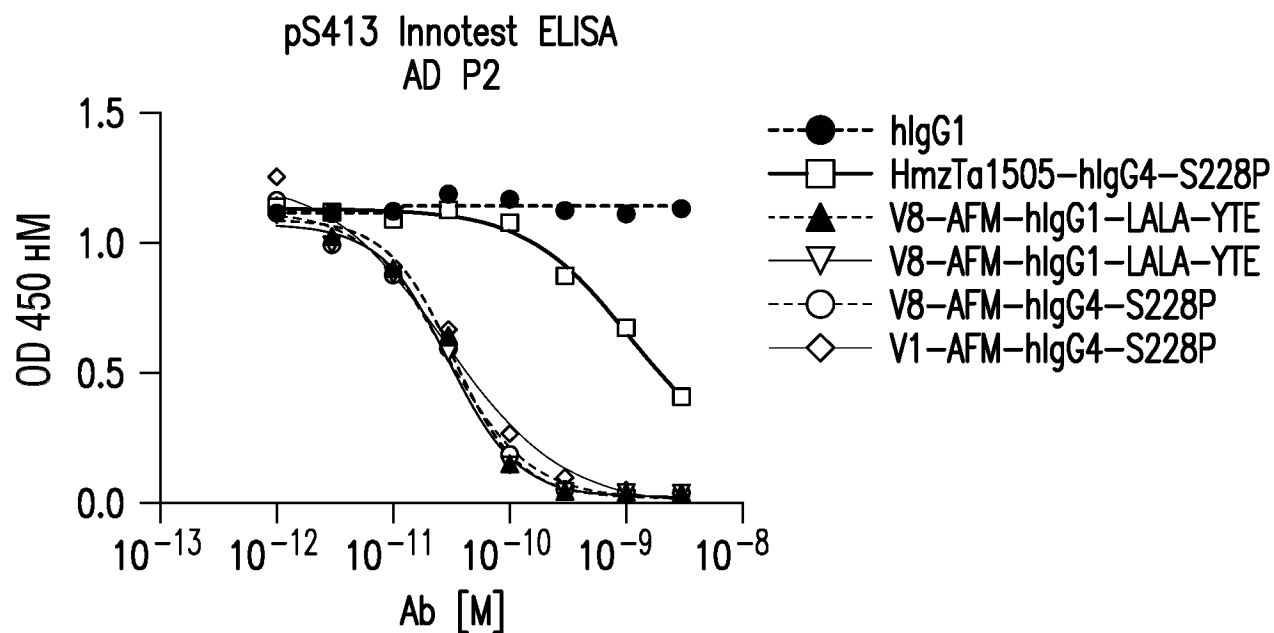
ФИГ.2Е



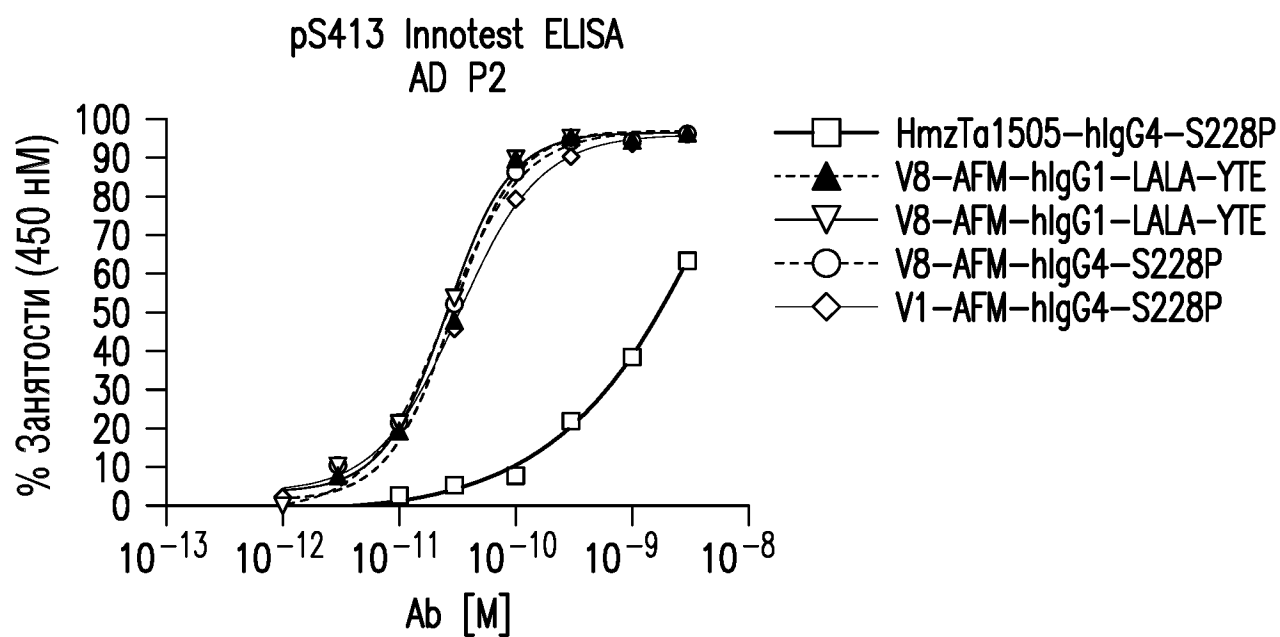
ФИГ.2F



ФИГ.3А



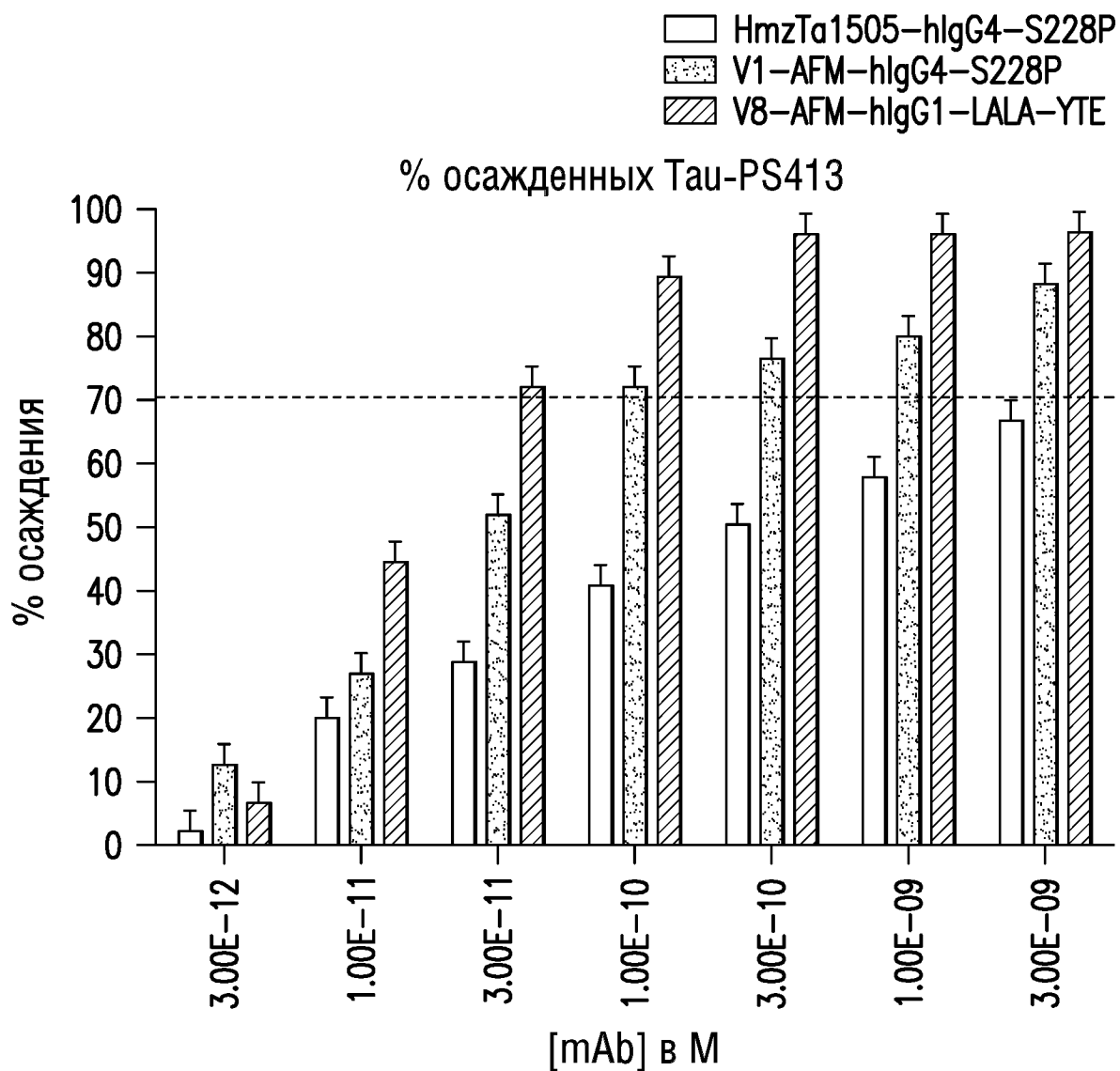
ФИГ.3В



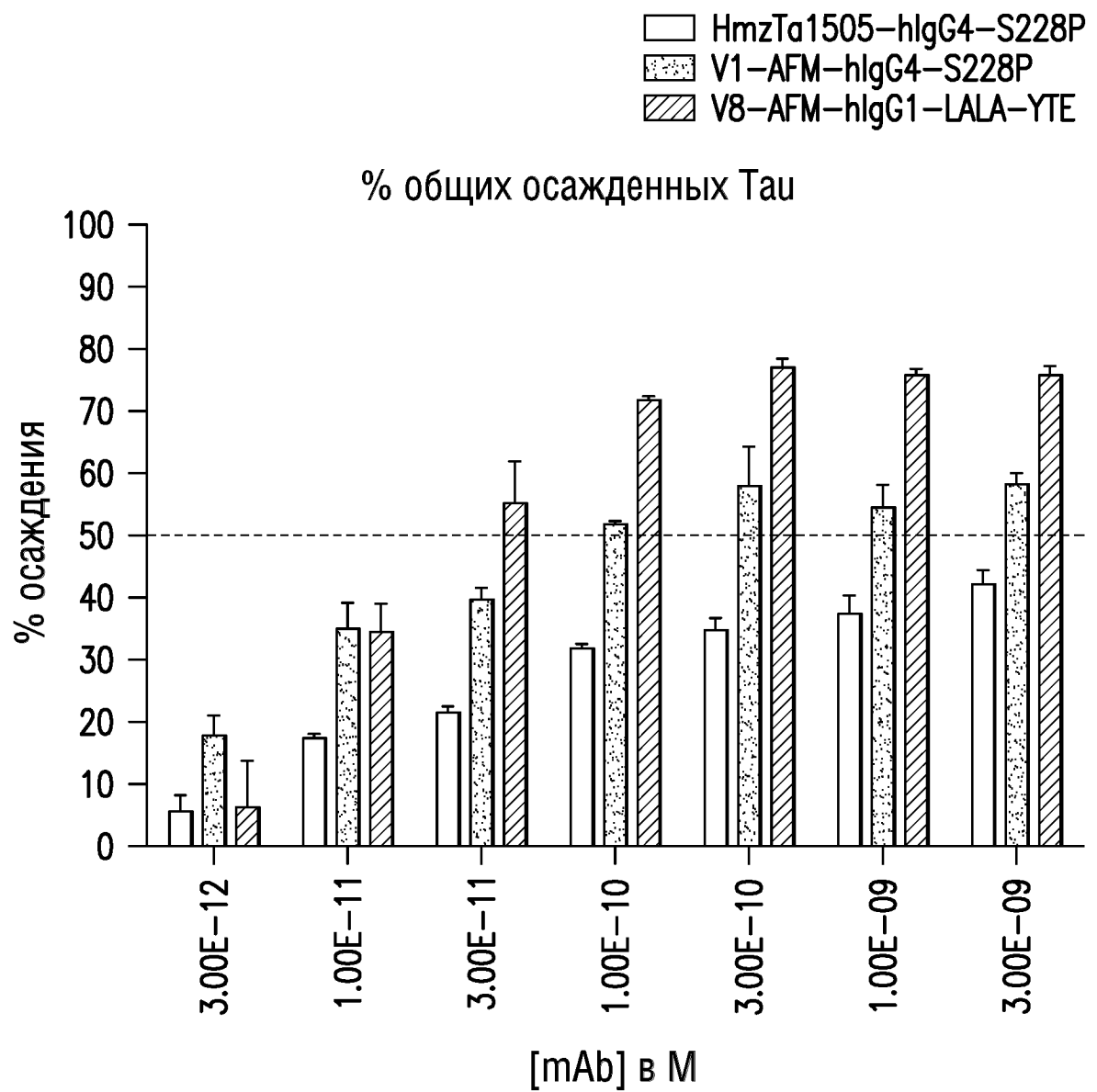
ФИГ.4А



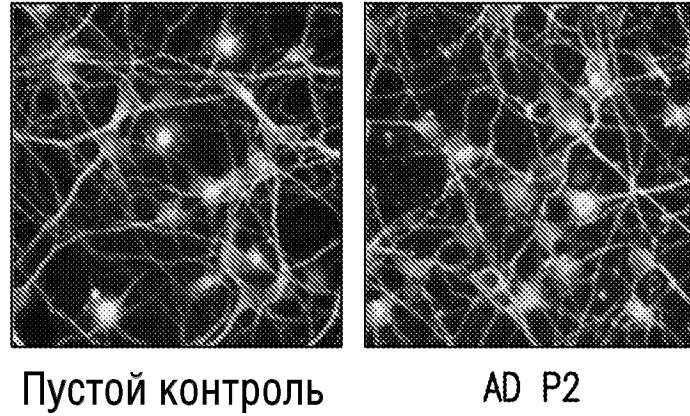
ФИГ.4В



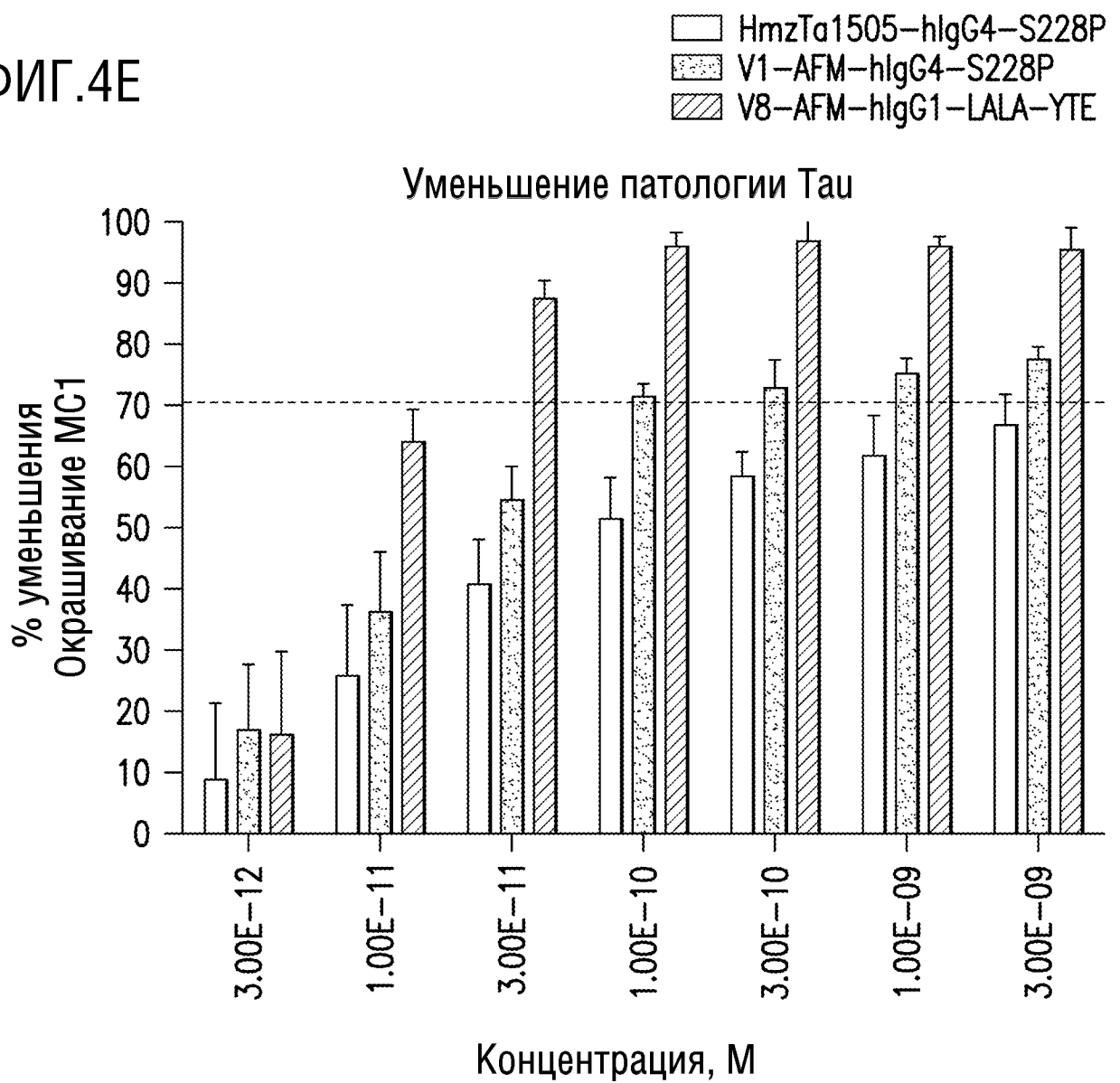
ФИГ.4С



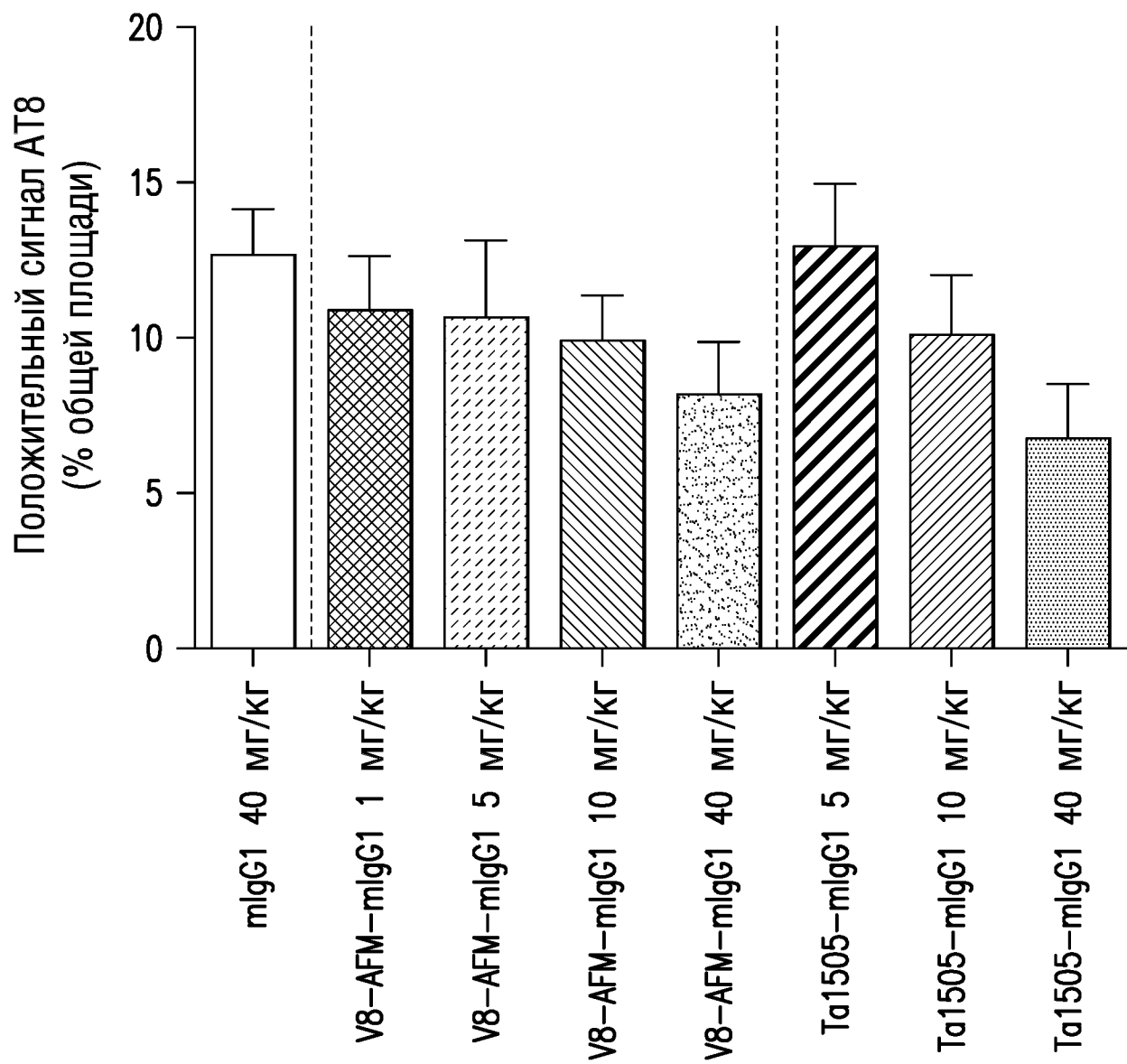
ФИГ.4D



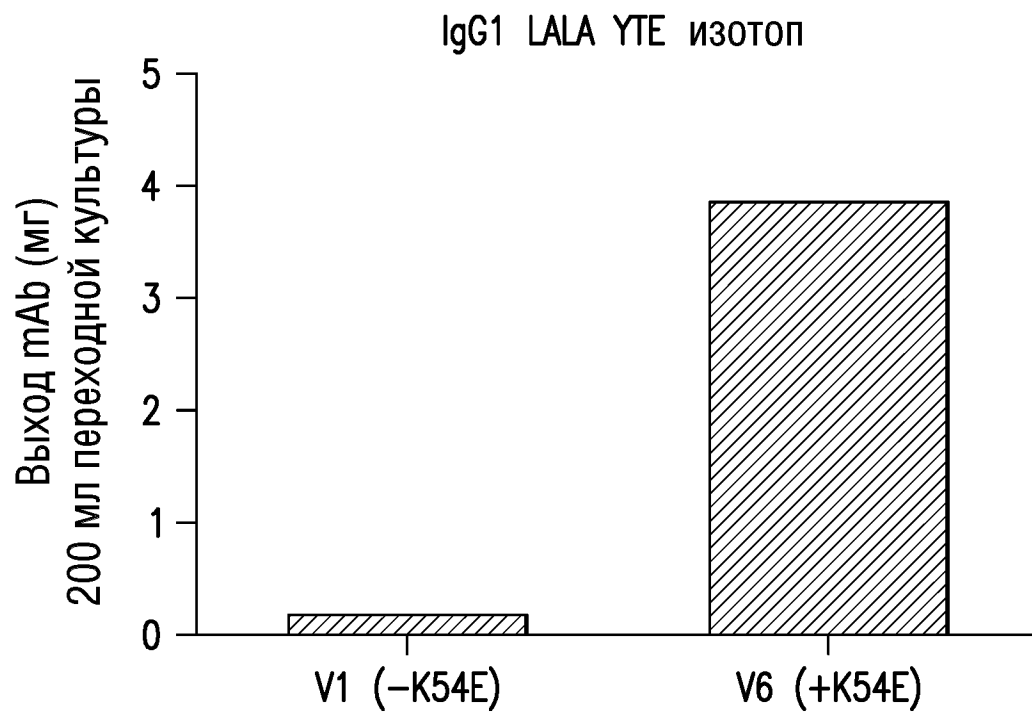
ФИГ.4E



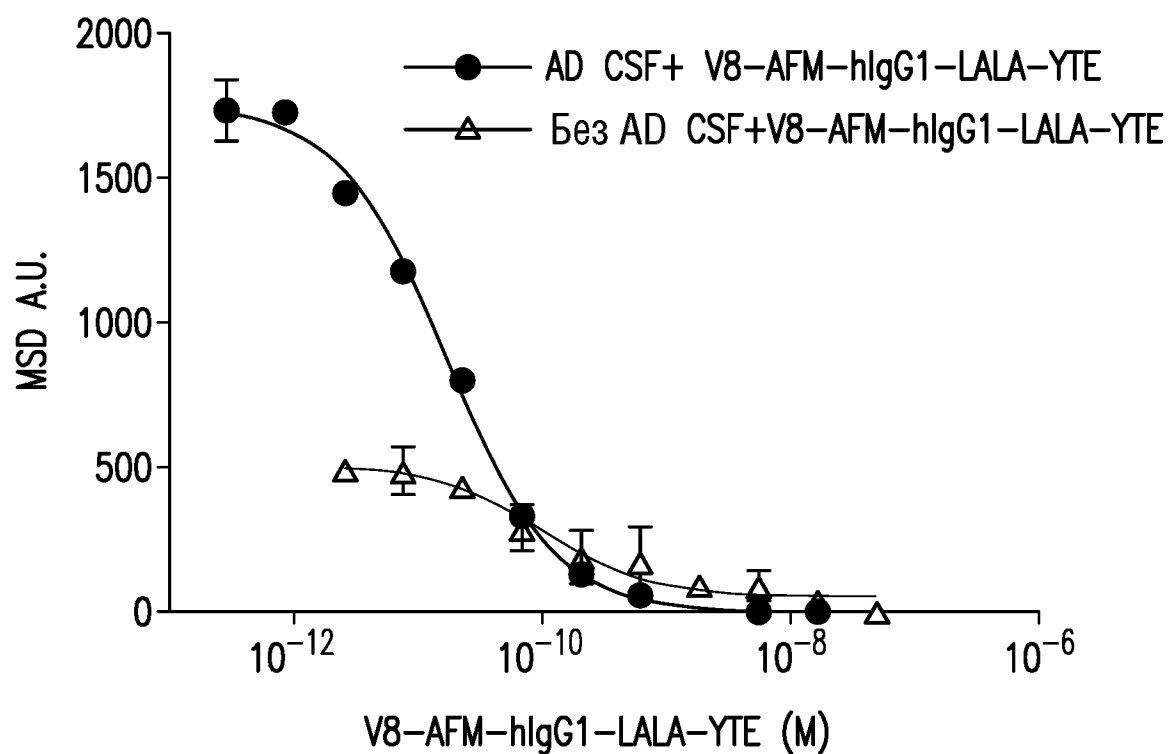
ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7А



ФИГ.7В

