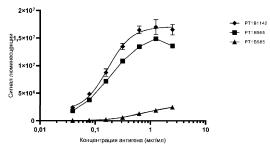
- (43) Дата публикации заявки 2023.11.21
- (22) Дата подачи заявки 2022.03.25

- (51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
- (54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К ПАРНЫМ СПИРАЛЬНЫМ ФИЛАМЕНТАМ ТАУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ
- (31) 63/166,524; 63/269,225
- (32) 2021.03.26; 2022.03.11
- (33) US
- (86) PCT/IB2022/052763
- (87) WO 2022/201122 2022.09.29
- (71) Заявитель: ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)
- (72) Изобретатель: Нанджунда Рупеш, Чаудхури Партха, Ша Ферн (US)
- (74) Представитель:
  Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
  Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
  А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
  Кузнецова Т.В. (RU)
- (57) Описаны гуманизированные антитела к PHF-тау и их антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, конъюгаты и слитые конструкции антител, композиции, содержащие антитела, способы получения антител и применения антител для лечения или профилактики таких состояний, как таупатии.



# ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К ПАРНЫМ СПИРАЛЬНЫМ ФИЛАМЕНТАМ ТАУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

5

10

15

20

25

30

#### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящая заявка относится к гуманизированным антителам к парным спиральным филаментам тау (РНГ-тау), конъюгатам антител, нуклеиновым кислотам и экспрессионным векторам, кодирующим такие антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим такие векторы, и композициям, содержащим такие антитела. Также предложены способы получения антител, способы применения антител для лечения патологических состояний, включая таупатии, и способы применения антител для диагностики заболеваний, таких как таупатия.

## ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0003] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде посредством EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII с именем файла «065768.98US2 Sequence Listing», датой создания 8 марта 2022 г. и размером 125 Кб. Перечень последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой дегенеративное расстройство мозга, клинически характеризуемое прогрессирующей потерей памяти, когнитивных функций, способности к рассуждению, принятию решений и эмоциональной устойчивости, что постепенно приводит к глубокому умственному нарушению и в конечном итоге смерти. БА является очень частой причиной прогрессирующего умственного угасания (деменции) у пожилых людей и считается четвертой по частоте медицинской причиной смерти в США. БА наблюдается в различных этнических группах по всему миру и является сегодня и останется в будущем одной из основных проблем здравоохранения.

[0005] В мозге пациентов с БА наблюдаются характерные повреждения, называемые сенильными (или амилоидными) бляшками, амилоидной ангиопатией (амилоидными отложениями в кровеносных сосудах) и нейрофибриллярными клубками. У пациентов с БА обычно обнаруживают большие количества таких повреждений, в особенности амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков из парных спиральных филаментов, в нескольких областях мозга человека, важных для памяти и когнитивных функций.

[0006] На данный момент лечение БА включает только лекарственные препараты, одобренные для лечения когнитивных симптомов у пациентов с деменцией. Не существует одобренных лекарственных препаратов, которые модифицируют или замедляют прогрессирование БА. Потенциальные модификаторы заболевания представляют собой анти-амилоидные антитела, включая Eli Lilly's Donanemab, гуманизированное моноклональное антитело IgG1, распознающее Аβ(р3–42), пироглутаматную форму Аβ и адуканумаб, человеческое моноклональное антитело IgG1 к конформационному эпитопу, обнаруженному на Аβ. Эти виды терапии и большинство других потенциальных модификаторов заболевания, которые могут выпускаться в следующем десятилетии, нацелены на Аβ (главный компонент амилоидных бляшек, которые являются одним из двух «отличительных» патологических признаков БА).

[0007] Нейрофибриллярные клубки, второй отличительный патологический признак БА, главным образом состоят из агрегатов гиперфосфорилированного тау-белка. Главной физиологической функцией тау-белка является полимеризация и стабилизация микротрубочек. Связывание тау-белка с микротрубочками происходит за счет ионных взаимодействий между положительными зарядами в области связывания тау-белка с микротрубочками и отрицательными зарядами на сетке микротрубочек (Butner and Kirschner, *J Cell Biol.* 115(3):717-30, 1991). Тау-белок содержит 85 возможных сайтов фосфорилирования, а фосфорилирование по многим из этих сайтов препятствует основной функции тау-белка. Тау-белок, связанный с сеткой аксональных микротрубочек, находится в состоянии гипофосфорилирования, тогда как агрегированному тау-белку при БА свойственны гиперфосфорилированность и формирование уникальных эпитопов, отличающихся от физиологически активного пула тау-белка.

[0008] Описана гипотеза о передаче и распространении таупатии, и она основана на стадиях развития в человеческом мозге таупатии по Брааку и таупатии,

распространяющейся после инъекций агрегатов тау-белка в доклинических моделях таупатии (Frost et al., J Biol Chem. 284:12845–52, 2009; Clavaguera et al., N at Cell Biol. 11:909-13, 2009).

5

10

15

20

25

30

[0009] Разработка терапевтических средств для профилактики или противодействия агрегации тау-белка уже многие годы вызывает большой интерес и потенциальные препараты, включая противодействующие агрегации соединения и ингибиторы киназы, достигли стадии клинических испытаний (Brunden et al., Nat Rev Drug Discov. 8:783-93, 2009). Были опубликованы несколько исследований, которые демонстрируют полезные терапевтические эффекты как активной, так и пассивной иммунизации тау-белком в моделях трансгенных мышей (Chai et al., J Biol Chem. 286:34457-67, 2011; Boutajangout et al., J Neurosci. 118:658-67, 2011; Boutajangout et al., J Neurosci. 27:9115-29, 2007). Сообщалось об активности как фосфонаправленных, так и нефосфонаправленных антител (Schroeder et al., J Neuroimmune Pharmacol. 11(1):9-25, 2016).

[0010] Несмотря на прогресс, остается потребность в эффективных терапевтических средствах, которые предотвращают агрегацию тау-белка и прогрессирование таупатии для лечения таупатий, таких как БА, и других нейродегенеративных заболеваний.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

гуманизированные антитела к РНГ-тау или их антигенсвязывающие фрагменты, которые обладают высокой аффинностью связывания к парным спиральным филаментам (РНГ)-тау и являются селективными для фосфорилированного тау. Гуманизированные антитела настоящей заявки были получены с помощью адаптированных для человеческого каркаса (НГА) мышиных РНГ-тау-специфических антител. Считается, что селективность антител для фосфорилированного тау-белка обеспечивает эффективность против патогенного тау-белка без нарушения нормальной функции тау-белка. В настоящей заявке также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, композиции, содержащие такие антитела, и способы получения и применения таких антител. Гуманизированные антитела к РНГ-тау или их антигенсвязывающие фрагменты настоящей заявки ингибируют агрегаты тау-белка, что измерено с помощью клеточных анализов с использованием агрегатов тау, полученных из лизатов клеток почек эмбриона человека (НЕК) или из лизатов с пинного мозга от мутантных тау-трансгенных мышей. Кроме того, химерное антитело

с вариабельными областями антител к PHF-тау настоящей заявки и константными областями мышиного Ig, такими как константные области мышиного IgG2a, блокируют активность агрегирования в *in vivo* мутантной тау-трансгенной мышиной модели.

[0012] Прогрессирование таупатии в головном мозге при БА следует отчетливым особым схемам распространения. Было показано, что в доклинических моделях внеклеточные агрегаты фосфо-тау-белка могут индуцировать таупатию в нейронах (Clavaguera et al., PNAS 110(23):9535-40, 2013). Таким образом, считается, что таупатия может распространяться подобно прионам от одной области головного мозга к другой. Этот процесс распространения может включать в себя экстернализацию агрегатов таубелка, которые могут захватываться близлежащими нейронами и могут индуцировать дальнейшую таупатию. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, считается, что антитела к PHF-тау или их антигенсвязывающие фрагменты настоящей заявки предотвращают агрегацию тау-белка или распространение таупатии в головном

мозге путем взаимодействия с агрегатами фосфо-тау-белка.

5

10

15

20

25

30

[0013] В одном общем аспекте заявка относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают PHF тау-белок. [0014] В другом общем аспекте заявка относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка, состоящем из аминокислотной последовательности или находящемся внутри аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают парные спиральные филаменты (PHF)-тау, предпочтительно PHF человеческого тау-белка. [0015] В соответствии с конкретным аспектом заявка относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка, состоящем из аминокислотной

SEQ ID NO: 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают парные спиральные филаменты (PHF)-тау, предпочтительно PHF человеческого таубелка, при этом эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435 тау-белка, но не содержит всех из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435.

последовательности или находящемся внутри аминокислотной последовательности

[0016] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющие

комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные

5

10

15

20

25

30

последовательности SEQ ID NO: 7 или 14, 8 и 9 соответственно; причем выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 12 или 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 13, 19, 23 или 59.

[0017] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12 или 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, 19, 23 или 59.

[0018] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- (а)вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13;
- (b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19;
- (c)вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23; или
- (d)вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 59.
- [0019] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:
  - (a) первую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15 или 20;

- (b) две легкие цепи, каждая из которых независимо имеет полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, 21, 24 или 60; и
- (c)вторую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17 или 22.
- 5 **[0020]** В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:
  - (a)тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 61 или 62; и
  - (а)легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, или 24, или 21, или 60 соответственно.
  - [0021] В другом общем аспекте заявка относится к конъюгату, содержащему выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки, связанные с антителом к CD98 или TfR или его антигенсвязывающим фрагментом.

10

25

30

- [0022] В соответствии с конкретным аспектом антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с CD98, предпочтительно человеческим CD98hc, или TfR, предпочтительно человеческим TfR1, соответственно с константой диссоциации K<sub>D</sub> по меньшей мере 1 нМ, предпочтительно 1−500 нМ, при нейтральном рН и константой k<sub>d</sub> скорости диссоциации по меньшей мере 10<sup>-4</sup> c<sup>-1</sup>, предпочтительно от 10<sup>-4</sup> до 10<sup>-1</sup> c<sup>-1</sup>, при кислотном рН, предпочтительно рН 5.
  - **[0023]** В соответствии с другим конкретным аспектом антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент имеют константу скорости диссоциации  $k_d$  от  $2 \times 10^{-2}$  до  $2 \times 10^{-4}$  с<sup>-1</sup>, предпочтительно  $8 \times 10^{-3}$  с<sup>-1</sup>, при нейтральном pH.
  - [0024] В соответствии с другим конкретным аспектом антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем:
    - (a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26, 27, 28 или 33, 29, 30 и 31 соответственно; или
    - (b) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела к TfR или его антигенсвязывающего фрагмента имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40 соответственно.

[0025] В соответствии с другим конкретным аспектом антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи, ковалентно связанную с вариабельной областью легкой цепи посредством линкера, при этом линкер предпочтительно имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 или 51, более предпочтительно scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 41.

5

10

15

20

25

30

[0026] В другом общем аспекте заявка относится к слитой конструкции, содержащей конъюгат настоящей заявки, в которой антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с карбокси-концом только одной из двух тяжелых цепей выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента посредством линкера, причем линкер предпочтительно имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

[0027] В соответствии с конкретным аспектом каждая из двух тяжелых цепей выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит одну или более гетеродимерных мутаций, таких как модифицированный гетеродимерный домен СН3, или одну или более мутаций «выступ-во-впадину» по сравнению с полипептидом домена СН3 дикого типа.

[0028] В соответствии с другим конкретным аспектом модифицированный гетеродимерный домен СН3 первой тяжелой цепи содержит аминокислотные модификации в положениях Т350, L351, F405 и Y407, а модифицированный гетеродимерный домен СН3 второй тяжелой цепи содержит аминокислотные модификации в положениях Т350, Т366, К392 и Т394, причем аминокислотная модификация в положении Т350 представляет собой Т350V, Т350I, Т350L или Т350М; аминокислотная модификация в положении L351 представляет собой L351Y; аминокислотная модификация в положении F405 представляет собой F405A, F405V, F405T или F405S; аминокислотная модификация в положении Y407 представляет собой Y407V, Y407A или Y407I; аминокислотная модификация в положении Т366 представляет собой T366L, T366I, T366V или Т366M, аминокислотная модификация в положении К392 представляет собой K392F, K392L или K392M, а аминокислотная

модификация в положении Т394 представляет собой Т394W, и при этом нумерация

аминокислотных остатков соответствует индексу EC, как указано в номенклатуре Кабата.

[0029] В соответствии с другим конкретным аспектом модифицированный гетеродимерный домен СН3 первой тяжелой цепи содержит мутацию Т366W, а модифицированный гетеродимерный домен СН3 второй тяжелой цепи содержит мутации Т366S, L368A и Y407V.

5

10

15

20

25

30

[0030] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более мутаций в Fc-домене, которые усиливают связывание слияния с неонатальным рецептором Fc (RcRn), причем предпочтительно одна или более мутаций усиливают связывание при кислотном pH, более предпочтительно Fc имеет мутации M252Y/S254T/T256E (YTE), при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу EC, как указано в номенклатуре Кабата.

[0031] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более мутаций в Fc-домене, которые уменьшают или устраняют эффекторную функцию, причем предпочтительно Fc имеет одну или более аминокислотных модификаций в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329, например одну, две или три мутации L234A, L235A и P331S, при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу EC, как указано в номенклатуре Кабата.

[0032] В другом общем аспекте заявка относится к слитой конструкции, содержащей:

- (а) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42–49;
- (b) две легкие цепи, каждая из которых независимо имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 21, 24 и 60; и
- (с)вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17 и 22.

[0033] В другом общем аспекте заявка относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки, конъюгату настоящей заявки или слитой конструкции настоящей заявки.

[0034] В другом общем аспекте заявка относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту настоящей заявки.

[0035] В другом общем аспекте заявка относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту настоящей заявки или вектор настоящей заявки.

5

10

15

20

25

30

[0036] В другом общем аспекте заявка относится к способу получения гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента настоящей заявки, конъюгата настоящей заявки или слитой конструкции настоящей заявки, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат или слитую конструкцию, в условиях для получения гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции и выделение гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции из клетки или клеточной культуры.

[0037] В другом общем аспекте заявка относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки, конъюгат настоящей заявки или слитую конструкцию настоящей заявки.

[0038] В другом общем аспекте заявка относится к способу блокирования агрегирования тау-белка у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки.

[0039] В другом общем аспекте заявка относится к способу индуцирования антителозависимого фагоцитоза (ADP) без стимуляции секреции провоспалительного цитокина у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки.

[0040] В другом общем аспекте заявка относится к способу лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки.

[0041] В другом общем аспекте заявка относится к способу снижения патологической агрегации тау-белка или распространения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки. [0042] В соответствии с конкретным аспектом таупатия выбрана из группы, состоящей из наследственной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобновисочной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием

нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с

кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, болезни Галлервордена — Шпатца, миозита с тельцами включения, болезни Крейцфельда — Якоба, множественной системной атрофии,

- болезни Ниманна Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugulistica (деменции боксеров).
- 10 **[0043]** В соответствии с другим конкретным аспектом фармацевтическую композицию вводят внутривенно.
  - [0044] В соответствии с другим конкретным аспектом фармацевтическую композицию доставляют через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) субъекта.
  - [0045] В соответствии с другим конкретным аспектом такое введение уменьшает Fc-опосредованную эффекторную функцию и/или не вызывает быстрого истощения ретикулоцитов.
  - [0046] В другом общем аспекте заявка относится к способу обнаружения присутствия РНГ-тау во взятой у субъекта биологической пробе, включающему приведение биологической пробы в контакт с гуманизированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом настоящей заявки и обнаружение связывания гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с РНГ-тау во взятой у субъекта пробе.
  - [0047] В соответствии с конкретным аспектом биологическая проба представляет собой пробу крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости.
  - [0048] Другие аспекты, признаки и преимущества изобретения в соответствии с вариантами осуществления заявки станут очевидны из представленного ниже описания, включая подробное описание заявки и ее предпочтительных вариантов осуществления, и прилагаемой формулы изобретения.

30

5

15

20

25

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0049] Вышеупомянутое краткое изложение, а также последующее подробное описание заявки станут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми

графическими материалами. Необходимо понимать, что заявка не ограничена точными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

[0050] На  $\Phi$ ИГ. 1 представлен график, на котором показано полученное методом иммуноферментного анализа (И $\Phi$ A) связывание гуманизированного варианта

РТ1В1142 с полноразмерным тау-белком по сравнению с РТ1В995 и РТ1В585.

[0051] На ФИГ. 2 представлен график, на котором показаны сигналы, полученные при ИФА, для термостабильности гуманизированного варианта РТ1В1142 в диапазоне температур по сравнению с РТ1В995 и РТ1В585.

[0052] На ФИГ. 3 представлен ряд графиков, на которых показаны полученные методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) репрезентативные данные по связыванию родительских и гуманизированных антител РТ66 с полноразмерным рекомбинантным тау-белком человека. Сенсограммы отражают ступенчатое введение тау-белка в режиме одноцикловой кинетики при 2,2 нМ, 6,7 нМ, 20 нМ и 60 нМ. Сплошные черные надпечатки указывают на соответствие общей кинетики модели Ленгмюра 1 : 1.

[0053] На ФИГ. 4 представлена ППР-сенсограмма связывания РТ1В1183 с полноразмерным рекомбинантным тау-белком. Сенсограммы отражают ступенчатое введение тау-белка в режиме одноцикловой кинетики при 1,1 нМ, 3,3 нМ, 10 нМ и 30 нМ. Время ассоциации для каждой концентрации тау-белка составляет 3 минуты, а время диссоциации составляет 120 минут. Сплошная черная надпечатка указывает на соответствие общей кинетики модели Ленгмюра 1 : 1.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0054] В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий или т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для заявки. Такое описание не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

Определения

5

10

15

20

25

30

[0055] Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное любому рядовому

специалисту в области, к которой относится данная заявка. В ином случае определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в описании. Необходимо отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает в себя объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

5

10

15

20

25

30

[0056] Если не указано иное, любое числовое значение, такое как концентрация или диапазон концентраций, описанное в настоящем документе, следует понимать как модифицированное во всех случаях термином «около». Таким образом, числовое значение, как правило, включает ±10% от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1% до 10% (масс./об.) включает от 0,9% (масс./об.) до 11% (масс./об.). В настоящем документе применение числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

[0057] В настоящем документе соединительный термин «и/или» между множеством перечисляемых элементов следует понимать как включающий в себя как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности одновременного применения первого и второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте настоящего документа. Кроме того, подразумевается, что одновременное применение более одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно,

удовлетворяет требованию термина «и/или».

[0058] В тексте данного описания и последующей формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово «содержать» и его варианты, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать как означающие включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. При применении в настоящем документе термин «содержащий» может быть заменен термином «вмещающий» или «включающий в себя» или иногда при применении в настоящем документе может быть заменен термином «имеющий».

[0059] При применении в настоящем документе термин «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не упомянутый в элементе формулы изобретения. При применении в настоящем документе термин «состоящий по существу из» не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики формулы изобретения. Любые из вышеупомянутых терминов «содержащий», «состоящий из», «включающий» и «имеющий» при применении в настоящем документе в контексте аспекта или варианта осуществления заявки могут быть заменены термином «состоящий из» или «состоящий по существу из» для варьирования объемов описания.

[0060] Используемый в настоящем документе термин «выделенный» означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был по существу отделен, получен отдельно или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т. е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были «выделены», включают в себя нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. «Выделенные» нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если такая композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также включает в себя нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные посредством рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

[0061] В контексте данного документа термин «антитело» или «иммуноглобулин»

используется в широком значении и относится к молекулам иммуноглобулинов или антител, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела включая мышиные, человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела и фрагменты антитела.

[0062] В целом антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые демонстрируют специфичность связывания с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Каждый из четырех подклассов IgG имеет различные биологические функции, известные как эффекторные функции. Эти эффекторные функции, как правило, опосредованы через взаимодействие

с рецептором Fc (FcγR) и/или путем связывания C1q и фиксации комплемента. Связывание с FcγR может приводить к антителозависимому клеточно-опосредованному цитолизу или антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), тогда как связывание с факторами комплемента может приводить к комплемент-

5

10

15

или человеческих антител.

- связывание с факторами комплемента может приводить к комплементопосредованному лизису клеток или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).
  Антитела настоящей заявки включают в себя антитела, которые имеют вариации в
  своей области Fc, так что они обладают измененными свойствами по сравнению с
  областями Fc дикого типа, включая, без ограничений, увеличенный период полужизни,
  уменьшенную или увеличенную ADCC или CDC, а также сайленсированные
  эффекторные функции Fc. Соответственно, антитела настоящей заявки могут
  относиться к любому из пяти основных классов или соответствующих подклассов.
  Антитела настоящей заявки предпочтительно представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или
  IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости
  от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух
  четко отличающихся типов, а именно, каппа и лямбда. Соответственно, антитела
  настоящей заявки могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда.
  В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела настоящей заявки
  включают в себя константные области тяжелой и/или легкой цепи из мышиных антител
- 20 [0063] В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепей антитела содержат вариабельные области легкой и тяжелой цепей. Вариабельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из «каркасной» области, прерываемой «антигенсвязывающими сайтами». Антигенсвязывающие сайты определяют с использованием различных терминов и схем нумерации, описанных ниже:
- (i) Кабат. «Определяющие комплементарность области» или «CDR» основаны на вариабельности последовательности (Wu and Kabat, *J Exp Med.* 132:211-50, 1970). Антигенсвязывающий участок по существу имеет три CDR в каждой вариабельной области (например, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в вариабельной области тяжелой цепи (VH) и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в вариабельной области
   30 легкой цепи (VL));
  - (ii) Чотиа. Термин «гипервариабельная область», «HVR» или «HV», относится к областям вариабельного домена антитела, которые гипервариабельны по структуре согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, *J Mol Biol*. 196:901-17, 1987). Антигенсвязывающий сайт по существу имеет по три

- гипервариабельные области в каждой из вариабельной областей тяжелой цепи VH (H1, H2, H3) и легкой цепи VL (L1, L2, L3). Системы нумерации, а также аннотации CDR и HV были пересмотрены Abhinandan и Martin (Abhinandan and Martin, *Mol Immunol*. 45:3832–9, 2008).
- (iii) ІМСТ. Другое определение областей, образующих антигенсвязывающий сайт, было предложено Lefranc (Lefranc et al., Dev Comp Immunol. 27:55–77, 2003), на основании сравнения V-доменов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов. В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMCT) представлены стандартизированная нумерация и определение этих областей. Соответствие
   между разграничениями CDR, HV и IMCT описано Lefranc et al., 2003, Id.;
  - (iv) AbM. Компромисс между схемами нумерации по Кабату и Чотиа представляет собой соглашение по нумерации AbM, описанное Martin (Martin ACR (2010) Antibody Engineering, eds Kontermann R, Dubel S (Springer-Verlag, Berlin), Vol 2, pp 33–51).
- 15 (v) Антигенсвязывающий сайт может также быть определен по «Specificity Determining Residue Usage» (SDRU) (Almagro, *Mol Recognit.* 17:132–43, 2004), в которой в качестве SDR представлены аминокислотные остатки иммуноглобулина, которые непосредственно участвуют в контакте с антигеном.
- [0064] Термины «каркас» или «каркасные последовательности» представляют собой оставшиеся последовательности вариабельной области антитела, которые отличаются от тех, которые определены как антигенсвязывающие сайты. Поскольку конкретное определение антигенсвязывающего сайта может быть сформулировано на основе разных признаков, как описано выше, конкретная каркасная последовательность зависит от определения антигенсвязывающего сайта. Каркасные области (FR) представляют собой более высоко консервативные участки вариабельных доменов.
  - представляют собой более высоко консервативные участки вариабельных доменов. Каждый из вариабельных доменов нативной тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR (соответственно FR1, FR2, FR3 и FR4), которые по существу принимают конфигурацию бета-листов, соединенных тремя гипервариабельными петлями.
    - Гипервариабельные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости при помощи FR и, вместе с гипервариабельными петлями из другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой сайта связывания, образованного определяющими комплементарность областями (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 227: 799-817, 1992; Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215:175-182, 1990). Несмотря на

30

высокую вариабельность последовательности, пять из шести петель имеют лишь небольшой набор конформаций основной цепи, называемый «каноническими структурами». Эти конформации, во-первых, определяются длиной петель и, вовторых, наличием ключевых остатков в определенных положениях в петлях и в каркасных областях, которые определяют конформацию посредством их упаковки, водородных связей или способности принимать необычные конформации основной цепи.

[0065] «Антитело» может также представлять собой один вариабельный домен на антителе с тяжелыми цепями (VHH), также называемое антителом, состоящим только из тяжелых цепей (HcAb), которое не содержит легких цепей и может естественным образом продуцироваться животными из семейства верблюдовых или акулами. Антигенсвязывающий участок HcAb состоит из фрагмента VHH.

[0066] Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу (например, химерному, гуманизированному или человеческому антителу или его антигенсвязывающему фрагменту), которое экспрессируется рекомбинантной клеткой-хозяином, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело. Примеры «клеток-хозяев» для продуцирования рекомбинантных антител включают: (1) клетки млекопитающих, например яичник китайского хомячка (СНО), СОЅ, клетки миеломы (включая клетки YO и NSO), почки новорожденного хомячка (ВНК), клетки Hela и Vero; (2) клетки насекомых, например sf9, sf21 и Tn5; (3) растительные клетки, например растений, принадлежащих к роду *Nicotiana* (например, *Nicotiana tabacum*); (4) дрожжевые клетки, например принадлежащие к роду

Saccharomyces (например, Saccharomyces cerevisiae) или роду Aspergillus (например,

Aspergillus niger); (5) бактериальные клетки, например клетки Escherichia, coli или

клетки Bacillus subtilis и т. п.

5

10

15

20

25

30

[0067] «Антигенсвязывающий фрагмент» антитела представляет собой молекулу, которая содержит часть полноразмерного антитела, способного обнаруживаемым образом связываться с антигеном, содержащую, как правило, одну или более частей по меньшей мере области VH. Антигенсвязывающие фрагменты включают в себя поливалентные молекулы, содержащие одну, две, три или более антигенсвязывающих частей антитела, и одноцепочечные конструкции, в которых области VL и VH или их выбранные части соединены синтетическими линкерами или с помощью рекомбинантных способов с образованием функциональной антигенсвязывающей молекулы. Антигенсвязывающие фрагменты также могут представлять собой

5

10

15

20

25

30

однодоменное антитело (sdAb), также известное как нанотело, которое представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного вариабельного домена антитела (VHH). Хотя некоторые антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены посредством фактической фрагментации более крупной молекулы антитела (например, ферментативным расщеплением), большинство из них обычно продуцируют с помощью рекомбинантных методик. Антитела настоящей заявки могут быть получены в виде полноразмерных антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя Fab, Fab',  $F(ab)_2$ ,  $F(ab')_2$ ,  $F(ab)_3$ ,  $F_V$  (как правило, домены VL и VH одного плеча антитела), одноцепочечный Fv (scFv, см., например, Bird et al., Science 1988; 242:423-426; и Huston et al. PNAS 1988; 85:5879-5883), фрагменты dsFv, Fd (как правило, домен VH и CH1) и dAb (как правило, домен VH); домены VH, VL, VHH и V-NAR; моновалентные молекулы, содержащие одну цепь VH и одну цепь VL; минитела, диатела, триатела, тетратела и каппа-тела (см., например, Ill et al., Protein Eng 1997; 10:949-57); верблюжий IgG; IgNAR; а также одну или более выделенных CDR или функциональный паратоп, причем выделенные CDR или антигенсвязывающие остатки или полипептиды могут быть ассоциированы или связаны вместе с образованием функционального фрагмента антитела. Различные типы фрагментов антител были описаны или рассмотрены, например, в Holliger и Hudson, Nat Biotechnol 2005; 23:1126-1136; WO2005040219 и опубликованных заявках на патент США 20050238646 и 20020161201. Фрагменты антител могут быть получены с использованием традиционных методик рекомбинантной или белковой инженерии, и эти фрагменты могут быть подвергнуты отбору на наличие антигенсвязывающей или другой функции таким же образом, как и интактные антитела.

[0068] Для получения фрагментов антитела было разработано множество методик. Традиционно эти фрагменты получали путем протеолитического расщепления полноразмерных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science 229:81 (1985)). Тем не менее эти фрагменты в настоящее время можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Альтернативно фрагменты Fab'-SH можно непосредственно выделять из *E. coli* и химически связывать с образованием фрагментов F(ab')2 (Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992)). Согласно другому подходу, фрагменты F(ab')2 можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. В других вариантах осуществления антитело выбора

представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). См. WO 1993/16185; патент США № 5,571,894; и патент США № 5,587,458. Фрагмент антитела также может представлять собой «линейное антитело», например, как описано в патенте США № 5,641,870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

[0069] Используемый в настоящем документе термин «производное антитела» относится к молекуле, содержащей полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем одна или более аминокислот химически модифицированы или замещены. Химические модификации, которые можно использовать в производных антител, включают в себя, например, алкилирование, пегилирование, ацилирование, образование сложного эфира или образование амида или т. п., например для связывания антитела со второй молекулой. Примеры модификаций включают в себя пегилирование (например, цистеин-пегилирование), биотинилирование, введение радиоактивной метки и конъюгирование со вторым агентом (таким как цитотоксический агент).

[0070] Антитела в настоящем документе включают в себя «варианты аминокислотной последовательности» с измененной антигенсвязывающей или биологической активностью. Примеры таких аминокислотных изменений включают в себя антитела с повышенной аффинностью к антигену (например, антитела с «созревшей аффинностью») и антитела с измененной областью Fc, если она присутствует, например с измененной (повышенной или пониженной) антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) и/или комплемент-зависимой цитотоксичностью (CDC) (см., например, WO 00/42072, Presta, L. и WO 99/51642, Iduosogie et al); и/или увеличенным или уменьшенным периодом полужизни в сыворотке (см., например, WO00/42072, Presta, L.).

[0071] «Мультиспецифическая молекула» содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые ассоциированы или связаны с по меньшей мере одной другой функциональной молекулой (например, другим пептидом или белком, таким как другое антитело или лиганд для рецептора), тем самым образуя молекулу, которая связывается с по меньшей мере двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Примеры мультиспецифических молекул включают в себя биспецифические антитела и антитела, связанные с растворимыми фрагментами рецептора или лигандами.

[0072] Используемый в настоящем документе термин «человеческое антитело» включает в себя антитела, имеющие вариабельные области, в которых как каркасные области, так и области CDR получены из (т. е. идентичны или по существу идентичны) последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также «получена из» последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела настоящей заявки могут включать в себя остатки аминокислот, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом in vitro или соматической мутацией in vivo). Однако термин «человеческое антитело», используемый в настоящем документе, не предполагает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности.

5

10

15

20

25

30

[0073] «Гуманизированное антитело» представляет собой человеческое/нечеловеческое химерное антитело, которое содержит минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из гипервариабельной области видов, отличных от человека (донорское антитело), таких как мышь, крыса, кролик или не относящийся к человеку примат, обладающих желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. В некоторых примерах FRостатки человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими нечеловеческими остатками. Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые отсутствуют в антителе реципиента или антителе донора. Эти модификации вносятся для еще большего улучшения показателей антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют петлям нечеловеческого иммуноглобулина, а все или по существу все FR-остатки представляют собой остатки последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может необязательно также содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Для получения более подробной информации см., например, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986);

Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992), WO 92/02190, заявку на патент США № 20060073137 и патенты США № 6,750,325, 6,632,927, 6,639,055, 6,548,640, 6,407,213, 6,180,370, 6,054,297, 5,929,212, 5,895,205, 5,886,152, 5,877,293, 5,869,619, 5,821,337, 5,821,123, 5,770,196, 5,777,085, 5,766,886, 5,714,350, 5,693,762, 5,693,761, 5,530,101, 5,585,089 и 5,225,539.

[0074] При использовании в настоящем документе термин «эпитоп» относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, расположенных рядом друг с другом в результате третичной укладки белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются под воздействием денатурирующих растворителей, тогда как структура эпитопов, образованных в результате третичной укладки, как правило, нарушается при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

[0075] «Антитело, которое связывается с тем же самым эпитопом», что и эталонное антитело, относится к антителу, которое блокирует связывание эталонного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более, и наоборот, эталонное антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более.

[0076] Способность антитела-мишени «блокировать» связывание молекулы-мишени с природным лигандом-мишенью означает, что антитело в анализе с использованием растворимых или ассоциированных с клеточной поверхностью молекул-мишеней и молекул-лигандов, может обнаруживаемым образом уменьшать связывание молекулымишени с лигандом в зависимости от дозы, когда молекула-мишень обнаруживаемым образом связывается с лигандом в отсутствие антитела.

**[0077]** В настоящем документе термин «тау» или «тау-белок» относится к встречающемуся в изобилии белку центральной и периферической нервной системы, имеющему множество изоформ. В центральной нервной системе (CNS) человека существует шесть основных изоформ тау-белка, имеющих длину от 352 до 441 аминокислот, обусловленных альтернативным сплайсингом (Hanger et al., *Trends Mol* 

*Med.* 15:112-9, 2009). Изоформы отличаются друг от друга регулируемым включением 0–2 N-концевых вставок и 3 или 4 тандемно организованных повторов связывания с микротрубочками и получили названия 0N3R (SEQ ID NO: 53), 1N3R (SEQ ID NO: 54), 2N3R (SEQ ID NO: 55), 0N4R (SEQ ID NO: 56), 1N4R (SEQ ID NO: 57) и 2N4R (SEQ ID

NO: 58). В настоящем документе термин «контрольный тау-белок» относится к изоформе тау-белка с SEQ ID NO: 58, в которой отсутствуют фосфорилирование и другие посттрансляционные модификации. В настоящем документе термин «тау-белок» включает белки, содержащие мутации, например точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и варианты сплайсинга полноразмерного тау-белка дикого типа. Термин «тау-белок» включает также пост-трансляционные модификации

5

10

15

20

25

1988).

аминокислотной последовательности тау-белка. К пост-транскрипционной модификации относится, без ограничений, фосфорилирование. В настоящем документе фраза «фосфорилированный S433 тау-белка» и аналогичные фразы относятся к фосфорилированной аминокислоте в определенном положении, например серину в положении 433, полноразмерного тау-белка дикого типа.

[0078] Тау-белок связывается с микротрубочками и регулирует транспорт карго через клетки, процесс, который можно модулировать фосфорилированием тау-белка. В БА и связанных расстройствах аномальное фосфорилирование тау-белка является доминирующим и считается предшественником и/или инициатором агрегации таубелка в фибриллы, получившие название парных спиральных филаментов (PHF). Основным компонентом PHF является гиперфосфорилированный тау-белок. В контексте настоящего документа термин «тау парных спиральных филаментов» или «РНF-тау» относится к тау-агрегатам в парных спиральных филаментах. В электронной микроскопии явно проявляются две основные области в структуре PHF: рыхлая оболочка и центральный филамент; при этом рыхлая оболочка чувствительна к протеолизу и расположена снаружи филаментов, а устойчивое к протеазе ядро филаментов образует каркас PHF (Wischik et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:4884-8,

[0079] Под «выделенным гуманизированным антителом, которое связывается с PHF-тау» или «выделенным гуманизированным антителом к PHF-тау» в настоящем документе подразумевается гуманизированное антитело к PHF-тау, которое по существу не содержит других антител, имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное гуманизированное антитело к PHF-тау по существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от PHF-тау).

Однако выделенное гуманизированное антитело к PHF-тау может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например антигенами других биологических видов (например, видовыми гомологами PHF-тау).

5

10

15

20

25

30

[0080] При использовании в настоящем документе термин «специфически связывает» или «специфическое связывание» относится к способности антитела к PHF-тау настоящей заявки связываться с предварительно заданной мишенью с константой (K<sub>D</sub>) диссоциации около  $1 \times 10^{-6} \,\mathrm{M}$  или теснее, например около  $1 \times 10^{-7} \,\mathrm{M}$  или менее, около  $1 \times 10^{-8} \,\mathrm{M}$  или менее, около  $1 \times 10^{-9} \,\mathrm{M}$  или менее, около  $1 \times 10^{-10} \,\mathrm{M}$  или менее, около  $1 \times 10^{-11} \,\mathrm{M}$  или менее, около  $1 \times 10^{-12} \,\mathrm{M}$  или менее или около  $1 \times 10^{-13} \,\mathrm{M}$  или менее. KD представляет собой отношение Kd к Ka (т. е. Kd / Ka) и выражается в молярной концентрации (М). Значения КD для антител можно определять с помощью способов данной области техники, относящихся к настоящему описанию. Например, значение KD для антитела к PHF-тау может быть определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например с использованием биосенсорной системы, например системы Biacore®, прибора ProteOn (BioRad), прибора KinExA (Sapidyne), ИФА или анализов конкурентного связывания, известных специалистам в данной области. Как правило, антитело к РНГ-тау связывается с предварительно заданной мишенью (т. е. PHF-тау) с  $K_D$ , которая по меньшей мере в десять раз меньше его  $K_D$  для неспецифической мишени по результатам измерений методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например, прибора ProteOn (BioRad). Однако антитела к РНГ-тау, которые специфически связываются с РНГ-тау, могут иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных мишеней, например в отношении той же самой предварительно заданной мишени от других биологических видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например Macaca fascicularis (яванский макак, cyno), Pan troglodytes (шимпанзе, chimp) или Callithrix jacchus (обыкновенная игрунка, marmoset). Если моноспецифическое антитело специфически связывает один антиген или один эпитоп, биспецифическое антитело специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа.

[0081] «Конъюгат» в контексте настоящего документа относится к антителу или белку, ковалентно связанному с одной или более гетерологичными молекулами, включая, без ограничений, терапевтический пептид или белок, антитело, метку или лекарственное средство для лечения неврологических расстройств.

[0082] При использовании в настоящем документе термин «связанный» относится к объединению или соединению двух или более объектов друг с другом. Применительно

к химическим или биологическим соединениям термин «связанный» может означать ковалентную связь между двумя или более химическими или биологическими соединениями. В качестве не имеющего ограничительного характера примера антитело настоящей заявки может быть связано с интересующим пептидом с образованием связанного с антителом пептида. Связанный с антителом пептид может быть образован путем проведения специфических химических реакций, предназначенных для конъюгирования антитела с пептидом. В определенных вариантах осуществления антитело настоящей заявки может быть ковалентно связано с пептидом настоящей заявки через линкер. Линкер может быть, например, сначала ковалентно соединен с антителом или пептидом, а впоследствии ковалентно соединен с пептидом или антителом.

5

10

15

20

25

30

[0083] «Линкер» в контексте настоящего документа относится к химическому линкеру или одноцепочечному пептидному линкеру, который ковалентно соединяет два разных объекта. Линкер может быть использован для соединения любых двух антител или их фрагментов, челнока гематоэнцефалического барьера, слитного белка и конъюгата настоящей заявки. Линкер может соединять, например, VH и VL в scFv, или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент со второй молекулой, такой как второе антитело. В некоторых вариантах осуществления, если моновалентный связывающий объект содержит scFv, направленный на CD98, предпочтительно человеческий CD98hc, а терапевтическая молекула содержит антитело, направленное на тау-белок, то линкер может соединять scFv с антителом, направленным на тау-белок. В некоторых вариантах осуществления, если моновалентный связывающий объект содержит scFv, направленный на TfR, предпочтительно huTfR1, а терапевтическая молекула содержит антитело, направленное на мишень ЦНС, такую как тау-белок, то линкер может соединять scFv с антителом, направленным на тау-белок. Можно использовать одноцепочечные пептидные линкеры, состоящие из 1–25 аминокислот, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот, соединенных пептидными связями. В определенных вариантах осуществления аминокислоты выбраны из двадцати встречающихся в природе аминокислот. В определенных других вариантах осуществления одна или более аминокислот выбраны из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Также можно применять химические линкеры, такие как углеводородный линкер, полиэтиленгликолевый (РЕG) линкер, полипропиленгликолевый (РРG) линкер, полисахаридный линкер, полиэфирный

линкер, гибридный линкер, состоящий из PEG и внедренного гетероцикла, и углеводородная цепь.

5

10

15

20

25

30

[0084] Используемый в настоящем документе термин «CD98» или «CD98hc» относится к интегральному мембранному белку, состоящему из кластера дифференцировки 98 тяжелой цепи (CD98hc), которая связывается с любой из множества легких цепей дисульфидной связью. При связывании с LAT1 или LAT2 комплексы-транспортеры гетеродимеров ведут себя как облигатные аминокислотные обменники. CD98hc имеет молекулярный вес около 80 кДа. Cd98hc предпочтительно представляет собой человеческий CD98hc (huCD98hc). huCD98hc кодируется геном SLC3A2.

[0085] Используемый в настоящем документе термин «рецептор трансферрина» или «ТfR» относится к рецептору клеточной поверхности, необходимому для клеточного поглощения железа в процессе рецептор-опосредованного эндоцитоза. Белок-носитель трансферрина. ТfR участвует в поглощении железа у позвоночных и регулируется в ответ на внутриклеточную концентрацию железа. Он импортирует железо путем интернализации комплекса трансферрин-железо посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. Были охарактеризованы два рецептора трансферрина у людей — трансферрин-рецептор 1 и трансферрин-рецептор 2. Оба этих рецептора представляют собой трансмембранные гликопротеины. TfR1 представляет собой универсально экспрессируемый рецептор с высокой аффинностью. TfR2 связывается с трансферрином с аффинностью в 25–30 раз меньшей, чем у TfR1. Экспрессия TfR2 ограничена определенными типами клеток и не зависит от внутриклеточных концентраций железа. В одном варианте осуществления TfR представляет собой

 $180\ 000\ дальтон$ , имея две субъединицы, каждая из которых имеет кажущуюся молекулярную массу около  $90\ 000\ дальтон$ . Предпочтительно TfR представляет собой человеческий TfR1 (huTfR1).

al. Nature 311: 675-678 (1984), например. Он может иметь молекулярную массу около

человеческий TfR, содержащий аминокислотную последовательность, как в Schneider et

[0086] Фразы «идентичность последовательности», или «процент (%) идентичности последовательности», или «% идентичности», или «% идентично» при использовании со ссылкой на аминокислотную последовательность описывают количество совпадений («попаданий») идентичных аминокислот двух или более выровненных аминокислотных последовательностей по сравнению с количеством аминокислотных остатков, образующих общую длину аминокислотных последовательностей. Другими словами, с использованием выравнивания для двух или более последовательностей может быть

определен процент аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности по всей длине аминокислотных последовательностей), когда последовательности сравниваются и выравниваются для максимального соответствия, измеренного с использованием алгоритма сравнения последовательностей, известного в данной области, или при ручном выравнивании и визуальной проверке. Таким образом, последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательности, могут отличаться заменой (-ами), добавкой (-ами) или делецией (-ями) аминокислот. Приемлемые программы для выравнивания белковых последовательностей известны специалисту в данной области. Процент идентичности последовательностей белковых последовательностей может, например, быть определен с помощью таких программ, как CLUSTALW, Clustal Omega, FASTA или BLAST, например, с использованием алгоритма NCBI BLAST (Altschul SF, et al (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402).

[0087] Термин «по существу идентичный» в контексте двух аминокислотных последовательностей означает, что последовательности при оптимальном выравнивании, например с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, имеют по меньшей мере примерно 50-процентную идентичность последовательностей. Как правило, последовательности, которые по существу идентичны, будут демонстрировать по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 98 или по меньшей мере около 99 процентов идентичности последовательностей.

[0088] Термин «полипептид» или «белок» обозначает молекулу, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться «пептидами».

[0089] В настоящем документе термин «полинуклеотид», который является синонимом термина «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, которые представляют

собой смесь одно- и двухцепочечных областей, слитые молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, как правило, двухцепочечными или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, «полинуклеотидом» называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин «полинуклеотид» также включает ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей. «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, как правило, встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин «полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

[0090] В настоящем документе термин «вектор» представляет собой репликон, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так, чтобы происходила репликация или экспрессия сегмента.

[0091] Используемый в настоящем документе термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты настоящей заявки. Термин «клетка-хозяин» может относиться к любому типу клетки, например к первичной клетке, клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В одном варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную молекулой нуклеиновой кислоты настоящей заявки. В другом варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или воздействий окружающей среды, которые могут происходить в последующих поколениях, или из-за интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[0092] Термин «экспрессия» в настоящем документе обозначает биосинтез продукта гена. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывает все посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения. Экспрессированное гуманизированное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают PHF-тау, могут находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для выращивания клеточной культуры, или могут быть прикреплены к клеточной мембране.

[0093] В настоящем документе термин «носитель» относится к любому эксципиенту,

5

10

15

20

25

30

разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не оказывает негативного влияния на эффективность композиции в соответствии с настоящей заявкой или биологическую активность композиции в соответствии с настоящей заявкой. В соответствии с конкретными вариантами осуществления и с учетом данного описания в рамках настоящей заявки можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, приемлемый для применения в фармацевтической композиции на основе антитела.

[0094] Используемый в данном документе термин «субъект» относится к животному, предпочтительно к млекопитающему. В соответствии с конкретными вариантами осуществления субъект представляет собой млекопитающее, включая млекопитающих, отличных от приматов (например, верблюда, осла, зебру, корову, свинью, лошадь, козу, овцу, кошку, собаку, крысу, кролика, морскую свинку или мышь) или приматов (например, обезьяну, шимпанзе или человека). В конкретных вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[0095] Термин «введение» применительно к способам настоящей заявки означает способ терапевтического или профилактического предотвращения, лечения или облегчения синдрома, расстройства или заболевания, как описано в настоящем документе, посредством применения антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата настоящей заявки или их формы, композиции или лекарственного средства. Такие способы включают введение эффективного количества указанного антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или их конъюгата или формы, композиции или лекарственного средства в разное время в течение курса лечения или одновременно в комбинированной форме. Способы настоящей заявки следует понимать как охватывающие все известные терапевтические схемы лечения.

5

10

15

20

25

30

[0096] Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к некоторому количеству активного ингредиента или компонента, которые индуцируют желаемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели. Например, для определения диапазона оптимальной дозы могут необязательно быть использованы анализы in vitro. Подбор конкретной эффективной дозы может выполнить (например, путем клинических исследований) специалист в данной области с учетом нескольких факторов, включая подлежащее лечению или профилактике заболевание, симптомы, массу тела пациента, состояние иммунной системы пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области. Точная доза, предназначенная для применения в составе, также зависит от способа введения и степени тяжести заболевания и должна быть определена на основании решения медработника и состояния каждого пациента. Эффективные дозы можно рассчитать на кривых дозовой зависимости, полученных в тестовых системах *in vitro* или животных моделей. [0097] Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению или возврату в исходное состояние по меньшей мере одного измеряемого физического параметра, связанного с таупатией, который не обязательно заметен у субъекта, но может быть заметен у субъекта. Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» могут также обозначать индуцирование регрессии, профилактику прогрессирования или по меньшей мере замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению, профилактике развития или появления или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с таупатией. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к повышению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

[0098] При применении в настоящем документе термин «таупатия» охватывает любые нейродегенеративные заболевания, которые связаны с патологической агрегацией таубелка в мозге. Наряду с наследственной и спорадической БА к другим примерам

5

10

15

20

25

30

таупатии относятся лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальная дегенерация, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменция с аргирофильными зернами, комплекс амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдром Дауна, болезнь Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, болезнь Галлервордена — Шпатца, миозит с тельцами включения, болезнь Крейцфельда — Якоба, множественная системная атрофия, болезнь Ниманна — Пика типа С, церебральная амилоидная ангиопатия с прионными белками, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническая дистрофия, негуамская мотонейронная болезнь с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитный паркинсонизм и хроническая травматическая энцефалопатия, такая как dementia pugulistica (деменция боксеров) (Morris et al., Neuron, 70:410–26, 2011). [0099] Термин «гематоэнцефалический барьер» или «ГЭБ» относится к физиологическому барьеру между периферическим кровообращением и головным и спинным мозгом, который образован плотными соединениями в эндотелиальных плазматических мембранах капилляров головного мозга, создавая плотный барьер, который ограничивает транспорт молекул в головной мозг. ГЭБ может ограничивать транспорт даже очень малых молекул, таких как мочевина (60 дальтон), в головной мозг. Примеры ГЭБ включают в себя ГЭБ в головном мозге, гемато-спинномозговой барьер внутри спинного мозга и гематоретинальный барьер внутри сетчатки, которые представляют собой смежные капиллярные барьеры внутри ЦНС. ГЭБ также охватывает гемато-СМЖ барьер (хороидное сплетение), где барьер состоит из эпендимальных клеток, а не эндотелиальных клеток капилляров. [00100] «Гематоэнцефалический рецептор» (сокращенно «Р/ГЭБ» в настоящем документе) представляет собой внеклеточный мембранно-связанный рецепторный белок, экспрессируемый на эндотелиальных клетках головного мозга, который может

документе) представляет собой внеклеточный мембранно-связанный рецепторный белок, экспрессируемый на эндотелиальных клетках головного мозга, который может транспортировать молекулы через ГЭБ или использоваться для транспорта экзогенных введенных молекул. Примеры Р/ГЭБ включают в себя, без ограничений, комплекс транспортера больших нейтральных аминокислот (LAT), включая компонент CD98, рецептор трансферрина (TfR), инсулиновый рецептор, рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-R), рецепторы липопротеинов низкой плотности, включая, без ограничений, белок 1, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP8), и белок 8, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP8), и

гепарин-связывающий фактор роста, подобный эпидермальному фактору роста (HB-EGF). Пример Р/ГЭБ в настоящем документе представляет собой CD98hc или рецептор трансферрина (TfR).

[00101] «Центральная нервная система» или «ЦНС» относится к комплексу нервных тканей, которые контролируют функции организма, и включает в себя головной и спинной мозг.

5

10

15

20

25

30

[00102] Термин «неврологическое расстройство» в настоящем документе относится к заболеванию или расстройству, которое негативно воздействует на ЦНС и/или которое имеет этиологию в ЦНС. Примеры заболеваний или расстройств ЦНС включают в себя, без ограничений, нейропатию, амилоидоз, рак, глазное заболевание или расстройство, вирусную или микробную инфекцию, воспаление, ишемию, нейродегенеративное заболевание, судороги, поведенческие расстройства и лизосомную болезнь накопления. Для целей настоящей заявки следует понимать, что ЦНС включает в себя глаза, которые обычно изолированы от остальной части тела гематоретинальным барьером. Конкретные примеры неврологических расстройств включают в себя, без ограничений, нейродегенеративные заболевания (включая, без ограничений, болезнь телец Леви, синдром постполиомиелита, синдром Шая — Дрейджера, оливопонтоцеребеллярную атрофию, болезнь Паркинсона, множественную системную атрофию, стриатонигральную дегенерацию, спиноцеребеллярную атаксию, спинальную мышечную атрофию), таупатии (включая, без ограничений, болезнь Альцгеймера и надъядерный паралич), прионные заболевания (включая, без ограничений, губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота, скрепи, синдром Крейцфельда — Якоба, куру, болезнь Герстмана — Штраусслера — Шейнкера, хроническое истощение и фатальную семейную бессонницу), бульбарный паралич, заболевание двигательных нейронов и гетеродегенеративные заболевания нервной системы (включая, без ограничений, болезнь Канавана, болезнь Хантингтона, нейрональный цероидлипофусциноз, болезнь Александера, синдром Туретта, синдром курчавых волос Менкеса, синдром Коккейна, синдром Галлервордена — Шпатца, болезнь Лафора, синдром Ретта, гепатолентикулярную дегенерацию, синдром Леша — Нихана и синдром Унферрихта — Лундборга), деменцию (включая, без ограничений, болезнь Пика и спиноцеребеллярную атаксию), рак (например, ЦНС и/или головного мозга, включая метастазы в головной мозг в результате рака в других частях тела).

[00103] «Лекарственное средство для лечения неврологических расстройств»

представляет собой лекарственное средство или терапевтический агент, используемые

5

10

15

20

25

HER2-положительного рака.

для лечения или облегчения последствий одного или более неврологических расстройств. Лекарственные средства для лечения неврологических расстройств настоящей заявки включают в себя, без ограничений, низкомолекулярные соединения, антитела, пептиды, белки, природные лиганды одной или белее мишеней ЦНС, модифицированные варианты природных лигандов одной или более мишеней ЦНС, аптамеры, ингибирующие нуклеиновые кислоты (т. е. малые ингибирующие РНК (миРНК) и короткие шпилечные РНК (кшРНК)), рибозимы или активные фрагменты любого из вышеперечисленного. Примеры лекарственных средств для лечения неврологических расстройств настоящей заявки описаны в настоящем документе и включают в себя, без ограничений: антитела, аптамеры, белки, пептиды, ингибирующие нуклеиновые кислоты и малые молекулы и активные фрагменты любого из вышеперечисленного, которые либо сами по себе, либо особым образом распознают и/или воздействуют на (т. е. ингибируют, активируют или обнаруживают) антиген ЦНС или молекулу-мишень, такую как, без ограничений, белокпредшественник амилоида или его части, бета-амилоид, бета-секретаза, гаммасекретаза, тау-белок, альфа-синуклеин, паркин, гентингтин, DR6, пресенилин, АроЕ, глиома или другие маркеры рака ЦНС и нейротрофины Не имеющие ограничительного характера примеры лекарственных средств для лечения неврологических расстройств и соответствующие расстройства, для лечения которых они могут применяться, следующие: нейротрофический фактор мозга (BDNF), хроническое повреждение головного мозга (нейрогенез), фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), рецептор антиэпидермального фактора роста, рак мозга, антитело к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR), нервный фактор, полученный из глиальной клеточной линии (GDNF), болезнь Паркинсона, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), боковой амиотрофический склероз, депрессия, лизосомальный фермент, лизосомальные нарушения накопления головного мозга, цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), боковой амиотрофический склероз, нейрегулин-1, шизофрения, антитело к HER2 (например, трастузумаб), метастазы в головной мозг в результате

30 **[00104]** Используемый в настоящем документе термин «антиген-мишень» или «мозговая мишень» относится к антигену и/или молекуле, экспрессируемым в ЦНС, включая головной мозг, на которые может быть нацелено антитело или малая молекула. Примеры таких антигенов и/или молекул включают в себя, без ограничений: бета-секретазу 1 (BACE1), бета-амилоид (Abeta), рецептор эпидермального фактора

роста (EGFR), рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), тау-белок, аполипопротеин E4 (ApoE4), альфа-синуклеин, CD20, гентингтин, прионный белок (PrP), киназа 2 с богатыми лейцином повторами (LRRK2), паркин, пресенилин 1, пресенилин 2, гамма-секретазу, рецептор смерти 6 (DR6), белок-предшественник амилоида (APP), рецептор нейротрофина р75 (р75NTR) и каспазу 6. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой BACE1. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой тау-белок.

5

10

15

20

25

30

[00105] Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, неприемлемо токсичных для субъекта, которому будут вводить состав.

[00106] В контексте настоящего документа «фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель» означает любое вещество, приемлемое для применения при введении субъекту. Например, фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой стерильный водный раствор, такой как фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) или вода для инъекций.

[00107] В контексте настоящего документа «фармацевтически приемлемые соли» означают физиологически и фармацевтически приемлемые соли соединений, таких как олигомерные соединения или олигонуклеотиды, т. е. соли, сохраняющие требуемую биологическую активность родительского соединения и не оказывающие нежелательного токсического воздействия.

[00108] Фармацевтически приемлемые кислые/анионные соли для применения в настоящей заявке включают в себя, без ограничений, ацетат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, битартрат, бромид, эдетат кальция, камзилат, карбонат, хлорид, цитрат, дигидрохлорид, эдетат, эдисилат, эстолат, эзилат, фумарат, глицептат, глюконат, глутамат, гликолиларсанилат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидроксинафтоат, йодид, изетионат, лактат, лактобионат, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромид, метилнитрат, метилсульфат, мукат, напсилат, нитрат, памоат, пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат и триэтиодид. Органические или неорганические кислоты также включают, без ограничений, йодистоводородную, перхлорную, серную, фосфорную, пропионовую, гликолевую, метансульфоновую, гидроксиэтансульфоновую, щавелевую, 2-нафталинсульфоновую,

п-толуолсульфоновую, циклогексансульфаминовую, сахариновую или трифторуксусную кислоту. Фармацевтически приемлемые основные/катионные соли включают, без ограничений, соли алюминия, 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол (также известен как трис(гидроксиметил)аминометан, трометан или «ТРИС»), соли аммония, бензатин, трет-бутиламин, соли кальция, хлоропрокаин, холин, циклогексиламин, диэтаноламин, этилендиамин, соли лития, L-лизин, соли магния, меглумин, N-метил-D-глюкамин, пиперидин, соли калия, прокаин, хинин, соли натрия, триэтиноламин или соли цинка.

[00109] Используемый в настоящем документе термин «в комбинации» в контексте введения пациенту двух или более лекарственных средств относится к применению более чем одной терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок введения субъекту лекарственных средств. Например, первое терапевтическое средство (например, описанную в настоящем документе композицию) можно вводить перед введением (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго терапевтического средства субъекту или одновременно с таким введением.

#### Гуманизированные антитела к РНГ-тау

[00110] В одном общем аспекте настоящая заявка относится к выделенным гуманизированным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают РНГ-тау. Такие антитела к РНГ-тау могут обладать свойством связываться с фосфорилированным эпитопом на РНГ-тау или связываться с нефосфорилированным эпитопом на РНГ-тау. Антителам к РНГ-тау могут найти применение в качестве терапевтических агентов и в качестве исследовательских или диагностических реагентов для определения РНГ-тау в биологических пробах, например в тканях или клетках.

**[00111]** В соответствии с одним конкретным аспектом заявка относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с тау-белком на эпитопе в С-концевом домене тау-белка. В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка,

имеющем аминокислотную последовательность или находящемся внутри аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают PHF-тау, предпочтительно PHF-тау человека. Выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка, состоящем из аминокислотной последовательности или находящемся внутри аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают PHF-тау, предпочтительно PHF-тау человека.

5

10

15

20

25

30

[00112] В некоторых вариантах осуществления эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного Т427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435 тау-белка, но не содержит всех из фосфорилированного Т427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435.

[00113] Гуманизированные антитела имеют каркасные остатки вариабельной области, по существу взятые из человеческого антитела (называемого акцепторным антителом), и определяющие комплементарность области по существу из мышиного антитела (называемого донорским иммуноглобулином). См. Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:10029-10033, 1989, WO 90/07861, US5693762, US5693761, US5585089, US5530101 и US5225539. Константная (-ые) область (-и), если присутствует(-ют), также получена (-ы) по существу или полностью из человеческого иммуноглобулина.

Вариабельные домены человека обычно выбирают из человеческих антител, каркасные последовательности которых проявляют высокую степень идентичности последовательности с доменами вариабельной области мыши, из которых были получены CDR. Каркасные остатки вариабельной области тяжелой и легкой цепи могут быть получены из одинаковых или различных последовательностей антител человека.

Последовательности антител человека могут представлять собой последовательности встречающихся в природе человеческих антител или могут быть консенсусными последовательностями нескольких человеческих антител. См. WO 92/22653. Некоторые аминокислоты из каркасных остатков вариабельной области человека выбирают для замены на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных воздействий осуществляется путем моделирования, изучения характеристик аминокислот в конкретных местоположениях или эмпирического наблюдения за эффектами замены или мутагенеза конкретных аминокислот.

[00114] Например, когда аминокислота отличается у каркасного остатка вариабельной области вариабельной области и выбранного каркасного остатка вариабельной области человека, аминокислота каркасной области человека обычно должна быть замещена эквивалентной аминокислотой каркасной области из антитела мыши, когда разумно ожидать, что аминокислота: (1) нековалентно связывает антиген напрямую, (2) является смежной с областью CDR, (3) иным образом взаимодействует с областью CDR (например, находится в пределах около 6 ангстрем в области CDR), или (4) участвует в поверхностном взаимодействии VL-VH.

[00115] Другие кандидаты для замены представляют собой акцепторные аминокислоты каркасной области человека, которые являются необычными для человеческого иммуноглобулина в этом положении. Эти аминокислоты могут быть замещены аминокислотами из эквивалентного положения донорного антитела мыши или из эквивалентных положений более типичных для человеческих иммуноглобулинов. Каркасы вариабельной области гуманизированных иммуноглобулинов обычно демонстрируют по меньшей мере 85% идентичности с каркасной последовательностью вариабельной области человека или консенсус таких последовательностей. Примеры замены каркаса включают в себя, например, описанные в примере 1 ниже.

[00116] Гуманизацию антитела можно осуществлять с помощью хорошо известных способов, таких как перекладка определяющих специфичность остатков (SDRR) (US2010/0261620), перекладка (Padlan et al., Mol. Immunol. 28:489-98, 1991), супергуманизация (WO 04/006955) и оптимизация содержимого строки (генома) человека (US7657380). Специалисты в данной области могут выбрать пригодные для прививки или гуманизации каркасные последовательности человека из соответствующих баз данных. Выбранные каркасы могут быть дополнительно модифицированы для сохранения или усиления аффинности связывания с помощью методик, таких как описанные в Queen et al., 1989, Id. Согласно конкретным вариантам осуществления способы гуманизации антител к PHF-тау из родительских мышиных антител включают описанные в примере 1 ниже.

[00117] Антитела настоящей заявки могут быть получены с помощью различных методик, например с помощью метода гибридомы (Kohler and Milstein, *Nature*. 256:495-7, 1975). Химерные моноклональные антитела, содержащие вариабельную область легкой цепи и тяжелой цепи, полученные из донорского антитела (как правило, мышиного) в комбинации с константными областями легкой и тяжелой цепей,

полученными из акцепторного антитела (как правило, другого вида млекопитающих, такого как человек), могут быть получены способом, описанным в US4816567. Моноклональные антитела с привитой областью CDR, имеющие CDR из донорского иммуноглобулина, не относящегося к человеку (как правило, мышиного), и оставшиеся производные от иммуноглобулина части молекулы, происходящие от одного или более иммуноглобулинов человека, могут быть получены методиками, известными специалистам в данной области, такими как описанные в US5225539. Полностью человеческие моноклональные антитела, в которых отсутствуют какие-либо нечеловеческие последовательности, можно получать из трансгенных по человеческим иммуноглобулинам мышей по методикам, описанным Lonberg et al., *Nature*. 368:856-9, 1994; Fishwild et al., *Nat Biotechnol*. 14:845-51, 1996; и Mendez et al., *Nat Genet*. 15:146-56, 1997. Человеческие моноклональные антитела также могут быть получены и оптимизированы из библиотек фаговых дисплеев (см., например, Knappik et al., *J Mol Biol*. 296:57-86, 2000; Krebs et al., *J Immunol Methods*. 254:67-84, 2001; Shi et al., *J Mol Biol*. 397:385-96, 2010).

[00118] В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7 или 14, 8 и 9 соответственно; причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают PHF-тау, предпочтительно PHF-тау человека, и при этом каркасные области в домене вариабельной области тяжелой цепи и в домене вариабельной области из человеческого иммуноглобулина.

[00119] В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно на по меньшей мере 85% или 90%, более предпочтительно на по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 12 или 18, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно на по меньшей мере

85% или 90%, более предпочтительно на по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 13, 19 или 23.

[00120] В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно на по меньшей мере 85% или 90%, более предпочтительно на по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 12 или 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно на по меньшей мере 85% или 90%, более предпочтительно на по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 13, 19 или 23.

[00121] В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23.

25

30

5

10

15

20

[00122] В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- (а)первую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15 или 20;
- (b) две легкие цепи, каждая из которых независимо имеет полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, 21, или 24, или 60; и
- (c)вторую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17 или 22.

[00123] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

5

10

15

20

25

30

- (b) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 61 или 62; и
- (c)легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, или 24, или 21, или 60 соответственно.

[00124] В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат первую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, две легкие цепи, имеющие полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, и вторую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат первую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, две легкие цепи, имеющие полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и вторую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат первую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, две легкие цепи, имеющие полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24, и вторую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат первую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, две легкие цепи, имеющие полипептидную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22.

[00125] В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело содержит две тяжелые цепи, каждая из которых имеет полипептидную последовательность SEQ ID NO: 61, и две легкие цепи, каждая из которых имеет полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16 или 24. В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело содержит две тяжелые цепи, каждая из которых имеет полипептидную последовательность SEQ ID NO: 62, и две легкие цепи, каждая из которых имеет полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21 или 60.

[00126] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с PHF-тау с константой диссоциации (KD)  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, предпочтительно с KD  $1 \times 10^{-9}$  М или менее или  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, при этом KD измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса, например с использованием системы Biacore или ProteOn.

5

10

15

20

25

30

[00127] Функциональная активность гуманизированных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с РНГ-тау, может быть охарактеризована способами, известными в данной области техники и описанными в данном документе. Способы определения характеристик антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с РНГ-тау, включают, но не ограничиваются ими, анализы аффинности и специфичности, включая анализ Biacore, твердофазный ИФА и цитометрию посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS). иммуногистохимический анализ; анализы клеток in vitro и анализы с инъекциями *in vivo* для определения эффективности антител при ингибировании агрегирования тау-белка; анализы на клеточную цитотоксичность для обнаружения наличия антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) и активности комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) антител; и т. д. В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы определения характеристик антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с РНГ-тау, включают способы, описанные в приведенных ниже примерах. Примером мышиного родительского антитела гуманизированных антител, связывающего РНГтау, но не контролирующего тау-белок, является антитело РТ3, которое описано в патенте США № 9,371,376, содержание которого полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

[00128] Для определения связывания эпитопа антител настоящей заявки могут быть задействованы несколько хорошо известных методологий. Например, в случае, когда известны структуры обоих отдельных компонентов, можно использовать анализ in silico прикрепления одного белка к другому белку для идентификации способных к взаимодействию участков. Может быть проведено замещение водорода дейтерием (H/D) в комплексе антигена и антитела для картирования участков антигена, связывающихся с антителом. Для определения местоположения важных для связывания с антителом аминокислот может быть применен сегментный и точечный

мутагенез антигена. Для идентификации остатков, участвующих в образовании эпитопа и паратопа, применяется со-кристаллическая структура комплекса антитело-антиген.

[00129] Антитела настоящей заявки могут быть биспецифическими или мультиспецифическими. Пример биспецифического антитела может связывать два отдельных эпитопа на PHF-тау или может связывать PHF-тау и бета-амилоид (Abeta). Другой пример биспецифического антитела может связывать PHF-тау и трансцитозный рецептор эндогенного гематоэнцефалического барьера, такой как инсулиновый рецептор, рецептор трансферрина, инсулиноподобный фактор роста-1 и рецептор липопротеинов. Пример антитела представляет собой антитело типа IgG1.

5

10

15

20

25

30

[00130] Иммуноэффекторные свойства антител настоящей заявки также могут быть усилены или приглушены за счет модификаций Fc с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области. Например, эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, понижение регуляции рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора Вклеток; BCR) и т. п., могут обеспечиваться и/или управляться модифицирующими остатками в Fc, ответственными за эти действия. Мутировавшие остатки в Fc-домене, увеличивающие период полужизни антител, могут также улучшать

фармакокинетические свойства (Strohl, Curr Opin Biotechnol. 20:685-91, 2009).

[00131] Антитело к РНГ-тау может не иметь эффекторной функции или иметь минимальную эффекторную функцию, но сохраняет свою способность связывать FcRn, связывание которого может быть основным средством продления периода полужизни антител *in vivo*. Связывание FcγR или комплемента (например, C1q) с антителом вызвано определенными белок-белковыми взаимодействиями в так называемом сайте связывания части Fc. Такие сайты связывания части Fc известны в данной области. Такие сайты связывания части Fc включают в себя, например, аминокислоты L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация в соответствии с индексом EC по Кабату). В некоторых вариантах осуществления антитело к PHF-тау содержит одну или более замен в одном или более сайтах связывания части Fc для устранения эффекторной функции. Например, выделенное антитело к PHF-тау может содержать область Fc, содержащую одну или более из следующих замен: замену пролина на глутамат в положении 233, аланина или валина на фенилаланин в положении 234 и аланина или глутамата на лейцин в положении 235 (нумерация EC, Кабат, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. U.S.

Dept. of Health and Human Services, Bethesda, Md., NIH Publication no. 91-3242). Предпочтительно интересующее антитело содержит одну, две или три мутации L234A, L235A и P331S (нумерация EC, Кабат).

[00132] Например, антитела подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, как правило,

демонстрируют активацию комплемента, включая связывание С1q и С3, тогда как IgG4

не активирует систему комплемента и не связывает С1q и/или С3. Fc-область

человеческого IgG4 обладает пониженной способностью к связыванию с FcγR и

факторами комплемента по сравнению с IgG других подтипов. Предпочтительно

антитело к PHF-тау настоящей заявки содержит область Fc, полученную из области Fc

человеческого IgG4. Более предпочтительно область Fc содержит область Fc

человеческого IgG4, имеющую замены, которые устраняют эффекторную функцию.

Например, удаление сайта N-связанного гликозилирования в области Fc IgG4 путем

замены Ala на Asп в положении 297 (нумерация EC) представляет собой еще один

способ обеспечить устранение остаточной эффекторной активности.

15

20

25

30

[00133] Кроме того, антитела настоящей заявки могут быть модифицированы посттрансляционно за счет таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или не встречающаяся в природе ковалентная модификация, такая как добавление фрагментов полиэтиленгликоля, и липидизация. Такие модификации могут происходить *in vivo* или *in vitro*. Например, антитела настоящей заявки могут быть конъюгированы с полиэтиленгликолем (пегилированы) для улучшения их фармакокинетических профилей. Конъюгация может быть выполнена методами, известными специалистам в данной области. Было показано, что конъюгация терапевтических антител с ПЭГ усиливает их фармакодинамику и при этом не изменяет функцию (Knight et al., *Platelets*. 15:409-18, 2004; Leong et al., *Cytokine*. 16:106-19, 2001; Yang et al., *Protein Eng*. 16:761-70, 2003)

[00134] В другом общем аспекте заявка относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки. Специалистам в данной области техники будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, путем замены, делеции, вставки и т. п.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты настоящей заявки, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков. Примеры выделенных

полинуклеотидов представляют собой полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, содержащие тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина, описанные в примерах (например, SEQ ID NO: 15-17, 20-22, 24 и 60-62), и полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, содержащие вариабельные области тяжелой цепи (VH) и вариабельные области легкой цепи (VL) (например, SEQ ID NO: 12, 13, 18, 19, 23 и 59. Другие полинуклеотиды, которые с учетом вырождения генетического кода или предпочтительности применения кодонов в данной экспрессирующей системе, кодируют антитела настоящей заявки, также находятся в пределах объема настоящей заявки. Выделенные нуклеиновые кислоты настоящей заявки можно получать с использованием хорошо известных рекомбинантных или синтетических методик. Кодирующие моноклональные антитела ДНК легко выделяются и секвенируются с применением способов, известных специалистам в данной области. При получении гибридомы такие клетки могут служить источником такой ДНК. В альтернативном варианте осуществления можно использовать дисплейные методики, в которых кодирующая последовательность и продукт трансляции соединены, например библиотеки фаговых или рибосомных дисплеев.

5

10

15

20

25

30

[00135] В другом общем аспекте заявка относится к вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, кодирующий гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания, такой как плазмида, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный экспрессионный вектор, такой как плазмида. Вектор может включать любой элемент для обеспечения стандартной функции экспрессионного вектора, например промотор, элемент для связывания с рибосомой, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. Ряд экспрессионных векторов, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известны в данной области и могут быть использованы в настоящем изобретении для получения в клетке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Для генерации рекомбинантного экспрессионного вектора в соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки можно использовать традиционные методики клонирования или синтеза искусственных генов. [00136] В другом общем аспекте заявка относится к клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид, кодирующий гуманизированное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки. В контексте настоящего описания для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов настоящей заявки можно применять любую клетку-хозяина, известную специалистам в данной области. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические клетки, бактериальные клетки, растительные клетки или клетки архей. Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышиные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (АТСС), г. Манассас, штат Вирджиния, США, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ЕСАСС), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ЕСАСС № 85110503), FO (АТСС CRL-1646) и Ag653 (АТСС CRL-1580). Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (АТТС CRL-TIВ-196). Другие используемые клеточные линии включают в себя линии, полученные из

5

10

15

20

25

30

[00137] В другом общем аспекте заявка относится к способу продуцирования гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента настоящей заявки, включающему культивирование клетки, содержащей полинуклеотид, кодирующий гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в условиях для получения гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента настоящей заявки, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с традиционными способами, известными в данной области.

клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHO-K1 SV (Lonza Biologics),

CHO-K1 (ATCC CRL-61, Invitrogen) или DG44.

## Конъюгаты и слитые конструкции с антителами к CD98 или антителами к TfR или их антигенсвязывающими фрагментами

[00138] Несмотря на то что гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) предотвращает попадание вредных веществ в головной мозг и является необходимым для гомеостаза головного мозга, он создает огромное препятствие для эффективной доставки лекарственных средств в головной мозг. Были изучены многочисленные подходы для улучшения доставки в головной мозг терапевтических моноклональных антител (мАт), включая применение рецептор-опосредованного трансцитоза (RMT). В RMT

5

10

15

20

25

30

используются обильно экспрессируемые рецепторы на люминальной стороне ГЭБ для транспорта через эндотелиальные клетки головного мозга. Предшествующая деятельность по созданию клинически осуществимой платформы для доставки терапевтических мАт в головной мозг была сосредоточена на конструировании антител для повышения эффективности трансцитоза, с успехами, достигнутыми благодаря наблюдениям за валентностью связывания, рН-зависимостью и аффинностью (рассмотрено в Goulatis et al., 2017, Curr Opin Struct Biol 45: 109-115). Однако трансляция на не относящихся к человеку приматов (NHP) и клинические испытания были ограничены быстрым периферическим клиренсом от опосредованного мишенью распределения лекарственного средства (ТМDD) и безопасностью от острого истощения ретикулоцитов (Gadkar K, et al. Eur J Pharm Biopharm. 2016; 101: 53-61). [00139] В общем аспекте заявка относится к гуманизированному антителу к РНГ-тау или его антигенсвязывающему фрагменту, связанным с оптимизированной платформой для доставки в головной мозг. Платформа использует CD98 или TfR-связывающую молекулу, в частности антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD98 или TfR, предпочтительно тяжелой цепью человеческого CD98 (huCD98hc) или человеческого TfR1 (huTfR1). Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что оптимальные значения — это не просто самые быстрые значения скорости ассоциации k<sub>a</sub> и самые медленные значения скорости диссоциации k<sub>d</sub>, как можно было бы ожидать при типичных взаимодействиях антитело-мишень. То есть для этой системы не обязательно использовать молекулу, которая «связывается» и ассоциируется с CD98 или TfR с относительно высокой скоростью, а затем более медленно диссоциирует от CD98 или TfR, чтобы иметь самый длительный жизненный цикл комплекса антитело-мишень. Вместо этого для оптимальной мозговой ФК и ФД агента (такого как мАт), подлежащего эффективной доставке антителом к СD98 или TfR или его антигенсвязывающим фрагментом, требуется промежуточная скорость диссоциации, которая не является ни слишком быстрой, ни слишком медленной. Также было обнаружено, что сконструированная константная область антител с повышенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn) приводила к уменьшению периферического клиренса и повышению концентрации в головном мозге. [00140] Дополнительные мутации Гс вводят для устранения связывания с гаммарецепторами Fc (FcyR) и предотвращения токсичности, опосредованной эффекторной функцией. В сочетании с высокоаффинным связывающим тау-белок мАт к тау-белку эти мутации предотвращают опосредованную эффекторной функцией токсичность на

периферии при сохранении антителозависимого фагоцитоза (ADP) через новый не-FcүR механизм микроглиального поглощения и деградации мишени. Этот механизм зависит от интернализации через CD98 или TfR и более эффективен в стимулировании деградации мишени, чем традиционный опосредованный FcүR ADP без стимуляции секреции провоспалительных цитокинов.

5

10

15

20

25

30

[00141] Предпочтительно антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки чувствительны к рН, например, они имеют разные аффинности связывания с CD98 или TfR при различных рН. Например, антитело к CD98 или TfR настоящей заявки может связываться с CD98 или TfR при нейтральном рН, таком как физиологический рН (например, рН 7,4), с высокой аффинностью, но при интернализации в эндосомальный компартмент диссоциирует от CD98 или TfR при кислотном рН, например при относительно более низком значении рН (рН 5-6,0). Аффинность представляет собой меру прочности связывания между двумя фрагментами, например антителом и антигеном. Аффинность может быть выражена различными способами. Один из способов заключается в выражении в терминах константы  $(K_D)$  диссоциации взаимодействия.  $K_D$  можно измерять стандартными способами, включая равновесный диализ, или прямым измерением значений скорости диссоциации и ассоциации антиген-антитело —  $k_{off}$  (kd или  $k_{dis}$ ) и  $k_{on}$  (или ka) скоростей соответственно (см., напр., *Nature*, 1993, 361:186-87). Отношение k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub> нивелирует все параметры, не связанные с аффинностью, и равно константе диссоциации К<sub>D</sub> (см. в ochoвном Davies et al., Annual Rev Biochem, 1990, 59:439-473). Таким образом, меньшее значение К<sub>D</sub> означает более высокую аффинность. Другое выражение аффинности представляет собой  $K_a$ , которое обратно  $K_D$ , или  $k_{on}/k_{off}$ . Таким образом, более высокое значение K<sub>a</sub> означает более высокую аффинность. Например, антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в композиции и/или способе настоящей заявки могут представлять собой антитело или его фрагмент, которые связываются с CD98 или TfR с K<sub>D</sub> 1 наномоль (нМ, 10<sup>-9</sup> М) или более при нейтральном рН (например, рН 6,8-7,8), таком как физиологический рН (например, рН 7,4) и диссоциируют от CD98 или TfR с  $k_{dis}$  10<sup>-4</sup> с<sup>-1</sup> или более при кислотном pH (например, рН 4,5-6,5), например рН 5,0.

[00142] Соответственно, общий аспект настоящей заявки относится к гуманизированному антителу к PHF-тау или его антигенсвязывающему фрагменту, связанным с антителом к CD98 или TfR или его антигенсвязывающим фрагментом для доставки в головной мозг нуждающегося в этом субъекта, причем антитело к CD98 или

ТfR или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с CD98, предпочтительно CD98hc, более предпочтительно человеческим CD98hc, или TfR, предпочтительно TfR1, более предпочтительно человеческим TfR1, с константой диссоциации  $K_D$  по меньшей мере 1 нM, предпочтительно от 1 нM до 500 нM, при нейтральном pH, и константой скорости диссоциации  $k_d$  по меньшей мере  $10^{-4}$  c<sup>-1</sup>, предпочтительно от  $10^{-4}$  до  $10^{-1}$  с<sup>-1</sup>, при кислотном pH, предпочтительно pH 5.

5

10

15

20

25

30

**[00143]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки имеет константу скорости диссоциации  $k_d$  от 2 x 10<sup>-2</sup> до 2 x 10<sup>-4</sup> c<sup>-1</sup>, например 2 x 10<sup>-2</sup>, 1 x 10<sup>-2</sup>, 9 x 10<sup>-3</sup>, 8 x 10<sup>-3</sup>, 7 x 10<sup>-3</sup>, 6 x 10<sup>-3</sup>, 5 x 10<sup>-3</sup>, 4 x 10<sup>-3</sup>, 3 x 10<sup>-3</sup>, 2 x 10<sup>-3</sup>, 1 x 10<sup>-3</sup>, 9 x 10<sup>-4</sup>, 8 x 10<sup>-4</sup>, 7 x 10<sup>-4</sup>, 6 x 10<sup>-4</sup>, 5 x 10<sup>-4</sup>, 4 x 10<sup>-4</sup>, 3 x 10<sup>-4</sup>, 2 x 10<sup>-4</sup> c<sup>-1</sup> или любое промежуточное значение, при нейтральном pH.

[00144] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с человеческим CD98 или TfR, представляют собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (Ну), ковалентно связанную с вариабельной областью легкой цепи  $(L_V)$  посредством гибкого линкера. ScFv может сохранять специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. В scFv порядок доменов может быть либо H<sub>V</sub>-линкер-L<sub>V</sub>, либо  $L_V$ -линкер- $H_V$ . Линкер может быть образован  $de\ novo$  или получен из известной белковой структуры для обеспечения совместимой длины и конформации при мостиковых соединениях вариабельных доменов scFv без серьезного стерического влияния. Линкер может иметь длину от 10 до около 25 аминокислот. Предпочтительно линкер представляет собой пептидный линкер, охватывающий около 3,5 нм (35 Å) между карбокси-концом вариабельного домена и амино-концом другого домена, не влияя на способность доменов складываться и образовывать интактный антигенсвязывающий сайт (Huston et al., Methods in Enzymology, vol. 203, pp. 46-88, 1991, полностью включено в настоящий документ путем ссылки). Линкер предпочтительно содержит гидрофильную последовательность, чтобы избежать интеркаляции пептида внутри вариабельных доменов или между ними за весь период сворачивания белка (Argos, Journal of Molecular Biology, vol. 211, no. 4, pp. 943–958, 1990). Например, линкер может содержать остатки Gly и Ser и/или вместе с заряженными остатками, такими как Glu, Thr и Lys, внедренными для повышения растворимости. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 50 (GGGSGGSGGCPPCGGSGG) или SEQ ID NO: 51 (CAAGCAGAAGACGGCATACGA). В контексте настоящего описания также можно использовать любой другой приемлемый линкер.

[00145] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD98 или к TfR или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем:

5

10

25

30

- (a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26, 27, 28 или 33, 29, 30 и 31 соответственно; или
- (b) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела к TfR или его антигенсвязывающего фрагмента имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40 соответственно.
- [00146] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи, ковалентно связанную с вариабельной областью легкой цепи посредством линкера, при этом линкер предпочтительно имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 или 51, более предпочтительно scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 41.
  - [00147] В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD98, предпочтительно CD98hc, более предпочтительно человеческим CD98hc, или которые связываются с TfR, предпочтительно TfR1, более предпочтительно человеческим TfR1, не содержат свободного цистеина.
  - [00148] В контексте настоящего описания антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент (такой как фрагмент scFv) могут быть получены с использованием приемлемых способов из данной области. Например, фрагмент scFv может быть получен рекомбинантным способом путем выращивания рекомбинантной клетки-хозяина (такой как бактериальная, дрожжевая клетка или клетка млекопитающих) в приемлемых условиях для получения фрагмента антитела и

выделения фрагмента из клеточной культуры. Примеры антител к CD98 или TfR или их антигенсвязывающих фрагментов встречаются, например, в US 63/036,020 и US 63/035,961, содержание которых полностью включено в настоящий документ.

5

10

15

20

25

30

[00149] Гуманизированное антитело к РНГ-тау или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки могут быть доставлены в комбинированной форме или связанны с антителом к CD98 или TfR или его антигенсвязывающим фрагментом парентерально, например внутривенно. Например, гуманизированное антитело к РНГтау или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть нековалентно присоединены к антителу к CD98 или TfR или его антигенсвязывающему фрагменту. Гуманизированное антитело к РНГ-тау или его антигенсвязывающий фрагмент также могут быть ковалентно присоединены к антителу к CD98 или TfR или его антигенсвязывающему фрагменту с образованием конъюгата. В определенных вариантах осуществления конъюгация осуществляется путем конструирования слияния белка (т. е. путем генетического слияния двух генов, кодирующих гуманизированное антитело к РНГ-тау или его антигенсвязывающий фрагмент, и антитела к CD98 или TfR или его антигенсвязывающего фрагмента и экспрессии в виде одного белка). Известные способы можно использовать для связывания гуманизированного антитела к РНГ-тау или его антигенсвязывающего фрагмента с антителом к CD98 или TfR или его антигенсвязывающим фрагментом с учетом настоящего описания. См., например, Wu et al., Nat Biotechnol., 23(9):1137-46, 2005; Trail et al., Cancer Immunol Immunother., 52(5):328-37, 2003; Saito et al., Adv Drug Deliv Rev., 55(2):199-215, 2003; Jones et al., Pharmaceutical Research, 24(9):1759-1771, 2007.

[00150] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело к РНГ-тау или его антигенсвязывающий фрагмент, подлежащие доставке в головной мозг, и антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть ковалентно связаны друг с другом (или конъюгированы) посредством непептидного линкера или пептидного линкера. Примеры непептидных линкеров включают в себя, без ограничений, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированный полиол, поливиниловый спирт, полисахариды, декстран, поливиниловый эфир, биоразлагаемый полимер, полимеризованный липид, хитины и гиалуроновую кислоту, или их производные, или их комбинации. Пептидный линкер может представлять собой пептидную цепь, состоящую из 1–50 аминокислот, связанных пептидными связями или их

производными, N-конец и C-конец которых могут быть ковалентно связаны с антителом к CD98 или TfR или его антигенсвязывающим фрагментом.

[00151] В определенных вариантах осуществления конъюгат настоящей заявки представляет собой мультиспецифическое антитело, содержащее первую

5

- антигенсвязывающую область, которая связывает PHF-тау, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывает CD98 или TfR. Способы получения мультиспецифических антител включают, без ограничений, рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелая цепь легкая цепь иммуноглобулина, имеющих разные специфичности (см. Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537, 1983), WO
- 93/08829, и Traunecker et al, *EMBO J.* 10: 3655, 1991), и технологию «выступ-вовладину» (см., например, патент США № 5,731,168). Мультиспецифические антитела также можно получать посредством конструирования электростатических управляющих эффектов (WO 2009/089004A1); поперечного сшивания двух или более антител или фрагментов (см., например, патент США № 4,676,980 и Brennan et al.,
- Science, 229: 81, 1985; использования лейциновых молний (см., например, Kostelny et al, *J. Immunol.*, 148(5): 1547–1553, 1992)); использования технологии «диатело» (см., например, Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448, 1993)); использования димеров одноцепочечных Fv (scFv) (см., например, Gruber et al, *J. Immunol*, 152:5368 (1994)); и получения триспецифических антител, как описано, например, в Tutt et al. *J.*
- 20 Іттипол. 147: 60, 1991. Мультиспецифическое антитело настоящей заявки также охватывает антитела, имеющие три или более функциональных антигенсвязывающих сайтов, включая «антитела-осьминоги» или «иммуноглобулины с двойным вариабельным доменом» (DVD) (см., например, US 2006/0025576A1 и Wu et al. Nature Biotechnology, 25(11):1290-7, 2007). Мультиспецифическое антитело настоящей заявки также охватывает «Fab двойного действия» или «DAF», содержащее
  - антигенсвязывающую область, которая связывается с CD98 или TfR, а также с мозговым антигеном (например, тау) (см., например, US 2008/0069820). В одном варианте осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела, причем различные такие фрагменты описаны в настоящем документе.
- 30 **[00152]** В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело настоящей заявки представляет собой слитую конструкцию, содержащую гуманизированное антитело к PHF-тау или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки, ковалентно связанные (или слитые) с антителом к CD98 или TfR или его антигенсвязывающим фрагментом. Антитело к CD98 или TfR или его

антигенсвязывающий фрагмент могут быть слиты с карбокси- и/или амино-концом легкой и/или тяжелой цепи гуманизированного антитела к PHF-тау или его антигенсвязывающего фрагмента непосредственно или посредством линкера.

[00153] В одном варианте осуществления антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент слиты с карбокси-концом легкой цепи гуманизированного антитела к PHF-тау или его антигенсвязывающего фрагмента непосредственно или посредством линкера.

5

10

15

20

25

30

[00154] В другом варианте осуществления антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент слиты с амино-концом легкой цепи гуманизированного антитела к PHF-тау или его антигенсвязывающего фрагмента непосредственно или посредством линкера.

[00155] В другом варианте осуществления антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент слиты с карбокси-концом тяжелой цепи гуманизированного антитела к PHF-тау или его антигенсвязывающего фрагмента непосредственно или посредством линкера.

[00156] В другом варианте осуществления антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент слиты с амино-концом тяжелой цепи гуманизированного антитела к PHF-тау или его антигенсвязывающего фрагмента непосредственно или посредством линкера.

[00157] В предпочтительном варианте осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно фрагмент scFv к huCD98hc или фрагмент scFv к huTfR1 настоящей заявки, ковалентно связанные посредством линкера с карбокси-концом только одной из двух тяжелых цепей гуманизированного антитела к PHF-тау или его

антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с PHF-тау. Предпочтительно линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (GGAGGA).

[00158] Для облегчения образования гетеродимера между двумя тяжелыми цепями, например одной со слиянием антитела к CD98 или TfR или его антигенсвязывающего фрагмента и одной без него, или одной, содержащей Fc для плеча к CD98 или TfR, и одной для плеча к PHF-тау, гетеродимерные мутации могут быть введены в Fc двух тяжелых цепей. Примеры таких мутаций Fc включают в себя, без ограничений, мутации Zymework (см., например, US10,457,742) и мутации «выступ-во-впадину» (см., например, Ridgway et al., *Protein Eng.*, 9(7): 617-621, 1996). В настоящей заявке также могут использоваться другие гетеродимерные мутации. В некоторых вариантах

5

10

15

20

25

30

осуществления модифицированный СНЗ, как описано в настоящем документе, используют для облегчения образования гетеродимера между двумя тяжелыми цепями. [00159] В некоторых вариантах осуществления каждая из двух тяжелых цепей выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит одну или более гетеродимерных мутаций, таких как модифицированный гетеродимерный домен СН3, или одну или более мутаций «выступ-во-впадину» по сравнению с полипептидом домена СН3 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления модифицированный гетеродимерный домен СН3 первой тяжелой цепи содержит аминокислотные модификации в положениях Т350, L351, F405 и Y407, а модифицированный гетеродимерный домен СН3 второй тяжелой цепи содержит аминокислотные модификации в положениях Т350, Т366, К392 и Т394, причем аминокислотная модификация в положении T350 представляет собой T350V, T350I, Т350L или Т350М; аминокислотная модификация в положении L351 представляет собой L351Y; аминокислотная модификация в положении F405 представляет собой F405A, F405V, F405T или F405S; аминокислотная модификация в положении Y407 представляет собой Y407V, Y407A или Y407I; аминокислотная модификация в положении Т366 представляет собой Т366L, Т366I, Т366V или Т366M, аминокислотная модификация в положении K392 представляет собой K392F, K392L или K392M, а аминокислотная модификация в положении T394 представляет собой T394W, и при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу ЕС, как указано в номенклатуре Кабата. В некоторых вариантах осуществления модифицированный гетеродимерный домен CH3 первой тяжелой цепи содержит мутации T350V, L351Y, F405A и Y407V, а модифицированный гетеродимерный домен CH3 второй тяжелой цепи содержит мутации Т350V, Т366L, К392L и Т394W. В некоторых вариантах осуществления модифицированный гетеродимерный домен СН3 первой тяжелой цепи содержит аминокислотную модификацию в положении Т366, а модифицированный гетеродимерный домен СН3 второй тяжелой цепи содержит аминокислотные модификации в положениях Т366, L368 и Y407, причем аминокислотная модификация в положении Т366 представляет собой Т366W или Т366S, аминокислотная модификация в положении L368 представляет собой L368A, и аминокислотная модификация в положении Y407 представляет собой Y407V. В некоторых вариантах осуществления модифицированный гетеродимерный домен СНЗ второй тяжелой цепи дополнительно содержит аминокислотные модификации H435R и Y436F для пресечения связывания с белком А и удаления гомодимеров «впадина-впадина» во

время очистки. В некоторых вариантах осуществления модифицированный гетеродимерный домен СН3 первой тяжелой цепи содержит мутацию Т366W, а модифицированный гетеродимерный домен СН3 второй тяжелой цепи содержит мутации Т366S, L368A, Y407V, H435R и Y436F.

5

10

15

20

25

30

- [00160] В дополнение к гетеродимерным мутациям также могут быть введены другие мутации. В некоторых вариантах осуществления область Fc слитой конструкции или биспецифического антитела дополнительно содержит одну или более мутаций, которые изменяют (увеличивают или уменьшают), предпочтительно устраняют, ADCC/CDC (например, мутации AAS, описанные в настоящем документе), и/или одну или более мутаций, которые изменяют (увеличивают или уменьшают), предпочтительно увеличивают, связывание слитой конструкции или биспецифического антитела с FcRn (например, мутации YTE, описанные в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления один или более цистеиновых остатков в слитой конструкции или биспецифическом антителе замещены другими аминокислотами, такими как серин. В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более мутаций в Fc-домене, которые усиливают связывание слияния с неонатальным рецептором Fc (RcRn), причем предпочтительно одна или более мутаций усиливают связывание при кислотном рН, более предпочтительно Fc имеет мутации M252Y/S254T/T256E (YTE), при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу ЕС, как указано в номенклатуре Кабата. В некоторых вариантах осуществления выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более мутаций в Fc-домене, которые уменьшают или устраняют эффекторную функцию, причем предпочтительно Fc имеет одну или более аминокислотных модификаций в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329, например одну, две или три мутации L234A, L235A и P331S, при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу ЕС, как указано в номенклатуре Кабата.
  - [00161] В определенных вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит:
    - (1) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42–49;

- (2) две легкие цепи, каждая из которых независимо имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 21, 24 и 60; и
- (3) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17 и 22.

5

[00162] В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки 10 содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную 15 последовательность SEQ ID NO: 42, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, две легкие цепи, 20 имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вторую 25 тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. 30 В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит 5

10

15

20

25

30

первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и

вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления слитая конструкция настоящей заявки содержит первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, две легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. [00163] Конъюгат, такой как мультиспецифическое антитело или слитая конструкция настоящей заявки, может быть получен любой из ряда методик, известных в данной области, с учетом настоящего описания. Например, он может быть экспрессирован из рекомбинантных клеток-хозяев, причем экспрессионный (-ые) вектор (-ы), кодирующий (-ие) тяжелую и легкую цепи слитой конструкции или мультиспецифического антитела, трансфицируется (-ются) в клетку-хозяина стандартными методиками. Клетки-хозяева могут представлять собой

5

10

15

20

25

30

[00164] В иллюстративной системе один или более рекомбинантных экспрессионных векторов, кодирующих гетеродимерные две тяжелые цепи и легкие цепи слитой конструкции настоящей заявки, вводят в клетки-хозяева посредством трансфекции или электропорации. Отобранные трансформированные клетки-хозяева культивируют для обеспечения экспрессии тяжелой и легкой цепей в условиях, достаточных для получения слитой конструкции, и слитую конструкцию выделяют из культуральной среды. Для получения рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и извлечения конструкта белка из культуральной среды используют стандартные методики молекулярной биологии.

прокариотические или эукариотические клетки-хозяева.

[00165] В настоящей заявке предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность антитела к CD98 или TfR или его антигенсвязывающего фрагмента как часть слитой конструкции или мультиспецифического антитела в любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, или любом из пунктов формулы изобретения. Выделенная нуклеиновая кислота может представлять собой часть вектора, предпочтительно экспрессионного вектора.

**[00166]** В другом аспекте заявка относится к клетке-хозяину, трансформированной вектором, описанным в настоящем документе. В варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, например *E. coli*. В другом варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку,

например клетку простейших, клетку животного, растительную клетку или клетку гриба. В варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, включая, без ограничений, СНО, СОS, NS0, SP2, PER.C6, или клетку гриба, например *Saccharomyces cerevisiae*, или клетку насекомых, такую как Sf9.

## 5 Фармацевтические композиции и способы лечения

10

15

20

25

30

[00167] Гуманизированные антитела к РНГ-тау настоящей заявки или их фрагменты, их коньюгаты или их слитые конструкции настоящей заявки можно использовать для лечения, уменьшения или предотвращения симптомов у пациентов с нейродегенеративным заболеванием, которое предполагает патологическую агрегацию тау-белка в головном мозге или таупатию, например у пациентов, страдающих от БА. [00168] Таким образом, в другом общем аспекте заявка относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, его коньюгат или его слитую конструкцию настоящей заявки и фармацевтически приемлемый носитель.

[00169] В другом общем аспекте заявка относится к способу блокирования агрегирования тау-белка у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки. Используемый в настоящем документе термин «агрегат тау-белка» относится к агрегату тау-белка, способному зарождать или «засеивать» внутриклеточную агрегацию тау-белка при интернализации клеткой или при воздействии мономерного тау-белка in vitro. Активность агрегирования тау можно оценивать в анализах агрегации клеток тау-белка, как описано в настоящем документе (см. также, например, патент США № 9,834,596, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки).

[00170] В другом общем аспекте заявка относится к способу лечения или уменьшения симптомов заболевания, расстройства или состояния, такого как таупатия, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки.

[00171] В другом общем аспекте заявка относится к способу снижения патологической агрегации тау-белка или распространения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки.

[00172] В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество гуманизированного антитела к PHF-тау или его антигенсвязывающего фрагмента, его

5

10

15

20

25

30

конъюгата или его слитой конструкции. В контексте настоящего документа «терапевтически эффективное количество» применительно к гуманизированным антителам к РНГ-тау или их антигенсвязывающим фрагментам означает количество гуманизированного антитела к РНГ-тау или его антигенсвязывающего фрагмента, его конъюгата или его слитой конструкции, которое приводит к лечению заболевания, расстройства или состояния; предотвращению или замедлению прогрессирование заболевания, расстройства или состояния; или уменьшению или полному облегчению симптомов, связанных с иммунным заболеванием, расстройством или состоянием. [00173] В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству препарата, которого достаточно для обеспечения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение серьезности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (іі) сокращение продолжительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ііі) профилактика прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) провоцирование регрессии заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (у) профилактика развития или появления заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) профилактика повторения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение вероятности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) снижение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) повышение выживаемости субъекта с заболеванием, расстройством или состоянием, подлежащим лечению, или связанным с ним симптомом; (хі) торможение или подавление заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического (их) или терапевтического (-их) эффекта (-ов) другой терапии.

[00174] В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или патологическое состояние, подлежащее лечению, представляет собой таупатию. В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, включает в себя, без ограничений,

семейную болезнь Альцгеймера, спорадическую болезнь Альцгеймера, лобновисочную деменцию с паркинсонизмом, связанную с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий супрануклеарный парез взора, кортикобазальную дегенерацию, синдром Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменцию, характеризующуюся появлением аргирофильных зерен, комплекс амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдром Дауна, синдром Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, синдром Галлервордена — Шпатца, миозит с тельцами включения, болезни Крейцфельда — Якоба, множественную системную атрофию, болезнь Ниманна — Пика типа С, церебральную амилоидную ангиопатию с прионными белками, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническую дистрофию, негуамскую болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм, хроническую травматическую энцефалопатию или dementia pugulistica (деменцию боксеров).

[00175] Связанный с таупатией поведенческий фенотип включает в себя, без ограничений, нарушения когнитивных функций, ранние изменения личности и расторможенность, апатию, патологическое безволие, задержку речи, нарушение целенаправленных движений, навязчивое повторение, стереотипные движения/поведение, гиперорализм, дезорганизацию, неспособность планировать или организовать последовательные задачи, эгоизм/черствость, антисоциальные черты, отсутствие эмпатии, запинание, аграмматическую речь с частыми парафазийными ошибками, но относительной сохранностью понимания, нарушение восприятия и трудности в подборе слов, медленно прогрессирующую неустойчивость походки, ретропульсию, застывание, частые падения, нечувствительную к леводопе аксиальную ригидность, супрануклеарный парез взора, прямоугольные саккадические осцилляции взора, медленные вертикальные саккады, псевдобульбарный синдром, апраксию конечностей, дистонию, кортикальную потерю чувствительности и тремор.

[00176] К подлежащим лечению пациентам относятся, без ограничений, не имеющие симптомов лица, подверженные риску БА или иной таупатии, а также пациенты, имеющие выраженные симптомы. Подлежащие лечению пациенты включают лиц, у которых имеется известный генетический риск БА, например присутствие заболевания в семейном анамнезе, или наличие генетических факторов риска в геноме. Примерами факторов риска являются мутации в белке-предшественнике амилоида (APP), особенно

в положении 717 и положениях 670 и 671 (мутации Hardy и Swedish соответственно). Другими факторами риска являются мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, и в АроЕ4, присутствие в семейном анамнезе гиперхолестеролемии или атеросклероза. Лиц, в настоящее время страдающих от БА, можно отличить от лиц с характерной деменцией по наличию описанных выше факторов риска. Кроме того, для выявления лиц, имеющих БА, имеется ряд диагностических тестов. Среди них — измерение уровней тау-белка и Abeta 42 в спинномозговой жидкости. Повышенный уровень тау-белка и пониженный уровень Abeta 42 указывают на наличие БА. Лиц, страдающих БА также можно диагностировать по критериям Ассоциации болезни Альцгеймера и связанных расстройств (AD and Related Disorders Association).

[00177] Антитела к РНГ-тау настоящей заявки можно применять как в качестве терапевтических, так и профилактических средств для лечения или профилактики нейродегенеративных заболеваний, которые связаны с патологической агрегацией таубелка, таких как БА или иные таупатии. Для не имеющих симптомов пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, приблизительно в 10, 15, 20, 25, 30 лет). Однако обычно необходимость в начале лечения не возникает, пока пациент не достигнет возраста приблизительно 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение, как правило, включает введение множества доз в течение некоторого периода времени. Ход лечения можно контролировать путем измерения ответа на терапевтический агент во времени по антителам или активированным Т-клеткам или В-клеткам. При падении ответа могут быть показаны повторные дозы.

[00178] В профилактических приложениях фармацевтические композиции или лекарственные средства вводят пациенту, уязвимому к или иным образом подверженному риску БА в количестве, достаточном для устранения или снижения риска, уменьшения степени тяжести или задержки начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, присутствующие в процессе развития заболевания. В терапевтических приложениях композиции или лекарственные средства вводят пациенту, у которого подозревается или уже подтверждено наличие такого заболевания в мере, достаточной для ослабления, прекращения или задержки развития любого из симптомов заболевания (биохимического, гистологического и/или поведенческого). Введение терапевтического агента может уменьшать или устранять умеренные нарушения когнитивных функций у пациентов, у которых еще не развилась характерная патология Альцгеймера.

[00179] Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, средства введения, участка-мишени, физиологического состояния субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли субъект человеком или животным, других введенных лекарственных средств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозировки лечения подбирали оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

5

10

15

20

25

30

[00180] В некоторых вариантах осуществления заявка относится к способу транспортировки гуманизированного антитела к РНГ-тау или его антигенсвязывающего фрагмента через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), включающему воздействие антитела к CD98 или TfR или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного с гуманизированным антителом к РНГ-тау или его антигенсвязывающим фрагментом, на гематоэнцефалический барьер таким образом, что антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент транспортирует гуманизированное антитело к РНГ-тау или его антигенсвязывающий фрагмент, связанный с ним, через гематоэнцефалический барьер. Предпочтительно антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент, его конъюгат или его слитая конструкция не препятствуют транспорту аминокислот. Антитело специфически связывается с CD98 или TfR таким образом, что оно не препятствует транспорту аминокислот. В некоторых вариантах осуществления ГЭБ присутствует у млекопитающего, предпочтительно примата, такого как человек, более предпочтительно человека, имеющего неврологическое расстройство. В одном варианте осуществления неврологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (БА), инсульта, деменции, мышечной дистрофии (МD), рассеянного склероза (MC), амиотрофического бокового склероза (ALS), муковисцидоза, синдрома Ангельмана, синдрома Лиддла, болезни Паркинсона, болезни Пика, болезни Паджета, рака и травматического повреждения головного мозга. [00181] Антитела настоящей заявки можно получать в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество антитела или антител, конъюгата или слитой конструкции в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Носитель может быть жидким, таким как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое

масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно применять 0,4%-й солевой раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Стерилизацию можно проводить с использованием стандартных, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрования).

Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты для регулирования и буферизации рН, стабилизаторы, загустители, увлажняющие и красящие агенты и т. п. Концентрация антител настоящей заявки в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т. е. от менее около 0,5%, обычно или по меньшей мере около 1%, и до 15 или 20% по массе, и определяется преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, вязкости и т. п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения.

5

10

15

20

25

30

[00182] Для введения предназначенных для терапевтического применения антител настоящей заявки можно применять любой подходящий путь введения, который обеспечивает доставку агента в организм-хозяин. Например, композиции, описанные в настоящем документе, могут быть составлены с обеспечением их приемлемости для парентерального введения, например интрадермального, внутримышечного, внутрибрюшинного, внутривенного, подкожного, интраназального или интракраниального, или их можно вводить в спинномозговую жидкость головного или спинного мозга.

[00183] Введение можно осуществлять по схеме с единственной дозой или по схеме со множеством доз, при которой основной курс лечения может включать 1–10 отдельных доз, после чего следуют другие дозы, вводимые в последующие временные интервалы, необходимые для поддержания и/или усиления ответа, например, вторая доза через 1–4 месяца и, если необходимо, последующая (-ие) доза (-ы) через несколько месяцев. К примерам приемлемых схем лечения относятся: (i) 0, 1 месяц и 6 месяцев, (ii) 0, 7 дней и 1 месяц, (iii) 0 и 1 месяц, (iv) 0 и 6 месяцев, или другие схемы, индуцирующие получение желаемых ответов, благодаря которым предположительно уменьшатся симптомы или тяжесть заболевания.

[00184] Антитела настоящей заявки могут быть лиофилизированы для хранения и перед применением восстановлены в приемлемом носителе. Было показано, что этот способ эффективен для антител и других белковых препаратов, при этом могут быть применены известные специалистам способы лиофилизации и восстановления.

[00185] В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиция, используемая для лечения таупатии, можно использовать в комбинации с другими агентами, которые эффективны для лечения связанных нейродегенеративных заболеваний. В случае БА антитела настоящей заявки можно вводить в комбинации с агентами, которые уменьшают или предотвращают отложение бета-амилоида (Abeta). Возможно, патологии РНГ-тау и Abeta являются синергетическими. Таким образом, комбинированная терапия, нацеленная на удаление патологий РНГ-тау и Abeta одновременно, и патологий, связанных с Abeta, в то же время может быть более эффективной, чем нацеливание на каждую из них по отдельности. В случае болезни Паркинсона и родственных нейродегенеративных заболеваний иммунная модуляция для удаления агрегированных форм белка альфа-синуклеина также представляет собой новую терапию. Комбинированная терапия, которая нацелена на удаление белков таубелка и альфа-синуклеина одновременно, может быть более эффективной, чем нацеливание на каждый белок по отдельности.

5

10

25

30

15 [00186] В другом общем аспекте заявка относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное антитело к РНГ-тау или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки, включающему объединение гуманизированного антитела к РНГ-тау или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

[00187] В другом варианте осуществления заявка относится к применению гуманизированного антитела к РНГ-тау или его антигенсвязывающего фрагмента, его конъюгата или его слитой конструкции настоящей заявки в производстве или получении лекарственного средства. В одном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для лечения неврологического заболевания или расстройства. В дополнительном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения неврологического заболевания или расстройства, включающем введение субъекту, имеющему неврологическое заболевание или расстройство, эффективного количества лекарственного средства.

[00188] Другой общий аспект настоящей заявки относится к способу индуцирования антителозависимого фагоцитоза (ADP) без стимуляции секреции провоспалительного цитокина у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту комплекса, содержащего гуманизированное антитело к PHF-тау или его антигенсвязывающий фрагмент, связанные, предпочтительно ковалентно

5

10

15

20

25

30

конъюгированные, с его антигенсвязывающим фрагментом связывающего фрагмента антитела к CD98 или TfR в соответствии с вариантом осуществления настоящей заявки, причем гуманизированное антитело к РНГ-тау или его антигенсвязывающий фрагмент не обладают эффекторной функцией. Например, гуманизированное антитело к РНГ-тау или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают или устраняют эффекторную функцию, такую как ADCC или CDC, например мутации, которые снижают или устраняют связывание с гамма-рецептором Fc. Такие мутации могут находиться в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329, например одна, две или три мутации L234A, L235A и P331S, причем нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу ЕС, как указано в номенклатуре Кабата. [00189] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включают введение субъекту эффективного количества дополнительного терапевтического агента. В определенных вариантах осуществления для лечения применяют дополнительный терапевтический агент, представляющий собой терапевтический агент, в той же степени эффективный для лечения того же или другого неврологического расстройства, что и гуманизированное антитело к РНГ-тау или его антигенсвязывающий фрагмент, его конъюгат или его слитая конструкция. Примеры дополнительных терапевтических агентов включают в себя, без ограничений, различные неврологические лекарственные средства, описанные выше, ингибиторы холинэстеразы (такие как допезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты NMDA-рецепторов (такие как мемантин), ингибиторы агрегации бета-амилоидного пептида, антиоксиданты, модуляторы у-секретазы, имитаторы фактора роста нервов (NGF) или генную терапию NGF, агонисты PPARy, ингибиторы HMS-CoA-редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты ГАМК-рецепторов, ингибиторы киназы гликогенсинтазы, внутривенный иммуноглобулин, агонисты мускариновых рецепторов, модуляторы никротиновых рецепторов, активную или пассивную иммунизацию бета-амилоидным пептидом, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты рецепторов серотонина и антитела к бета-амилоидному пептиду. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент выбран за его способность смягчать один или более побочных эффектов неврологического лекарственного средства. Дополнительный терапевтический агент можно вводить в тех же или отдельных составах и вводить вместе или раздельно с гуманизированным антителом к РНГ-тау или его

антигенсвязывающим фрагментом, его конъюгатом или его слитой конструкцией. Гуманизированное антитело к PHF-тау или его антигенсвязывающий фрагмент, его конъюгат или его слитую конструкцию настоящей заявки можно вводить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адъюванта. Гуманизированное антитело к PHF-тау или его антигенсвязывающий фрагмент, его конъюгат или его слитую конструкцию настоящей заявки также можно применять в комбинации с другими интервенционными видами терапии, такими как, без ограничений, радиационная терапия, поведенческая терапия или другие виды терапии, известные в данной области и подходящие для лечения или профилактики неврологического расстройства.

5

10

15

20

25

30

[00190] В другом аспекте заявка относится к промышленному изделию (например, набору), содержащему материалы, используемые для лечения или профилактики расстройств, описанных выше. Изделие промышленного производства может содержать контейнер и этикетку или листок-вкладыш на контейнере или соединенный с ним. Приемлемые контейнеры включают в себя, например, бутылки, виалы, шприцы, пакеты для инфузионных растворов и т. п. Контейнеры могут быть образованы из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией является эффективной для лечения или профилактики патологического состояния, и может иметь отверстие для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для инфузионного раствора или виалу, имеющую пробку, выполненную с возможностью прокалывания иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, его конъюгат или его слитую конструкцию настоящей заявки. На этикетке или листке-вкладыше указывается, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, промышленное изделие может включать в себя (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, причем композиция содержит антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат настоящей заявки; и (b) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, при этом композиция содержит дополнительный цитотоксический или иной терапевтический агент. Промышленное изделие в этом варианте осуществления настоящей заявки может дополнительно включать в себя листок-вкладыш, на котором указано, что композицию можно использовать для лечения конкретного состояния. Необязательно промышленное изделие может дополнительно включать в себя второй (или третий) контейнер,

содержащий фармацевтически приемлемый буферный раствор, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать в себя другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

## Диагностические методы и наборы

5

10

15

20

25

[00191] Гуманизированные антитела к РНГ-тау настоящей заявки можно применять в способах диагностики БА или иных таупатий у субъекта.

[00192] Таким образом, в другом общем аспекте заявка относится к способам обнаружения наличия PHF-тау у субъекта и способам диагностирования таупатий у субъекта посредством обнаружения наличия PHF-тау у субъекта с применением гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента настоящей заявки.

[00193] В одном варианте осуществления гуманизированное антитело к РНГ-тау или его антигенсвязывающий фрагмент, его конъюгат или его слитую конструкцию настоящей заявки применяют для обнаружения неврологического расстройства до появления симптомов и/или для оценки тяжести или продолжительности заболевания или расстройства. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, его конъюгат или его слитая конструкция позволяют обнаруживать и/или визуализировать неврологическое расстройство, включая визуализацию с помощью рентгенографии, томографии или магнитно-резонансной томографии (МРТ).

[00194] Фосфорилированный тау-белок может быть определен во взятой у субъекта биологической пробе (например, пробе крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости) путем приведения биологической пробы в контакт с диагностическим реагентом на основе антител и обнаружения связывания диагностического реагента на основе антител с фосфорилированным тау-белком во взятой у субъекта пробе. Анализ для проведения такого обнаружения включает в себя хорошо известные способы, такие как твердофазный ИФА, иммуногистохимию, вестерн-блоттинг или визуализацию *in vivo*.

30 [00195] Диагностические антитела или аналогичные реагенты могут быть введены путем внутривенной инъекции в тело пациента или напрямую в головной мозг соответствующим путем, который обеспечивает доставку агента в организм-хозяина. Дозировки антител должны находиться в тех же диапазонах, как и для способов лечения. Как правило, антитела метят, хотя в некоторых способах первичное антитело с

аффинностью к фосфорилированному тау-белку остается немеченым, но применяют вторичный метящий агент для связывания с первичным антителом. Выбор метки зависит от способа обнаружения. Например, флуоресцентная метка пригодна для оптического обнаружения. Применение парамагнитных меток пригодно для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки могут быть также определены с применением ПЭТ или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT).

[00196] Диагностирование выполняют путем сравнения количества, размера и/или интенсивности меченых PHF-тау, агрегатов тау-белка и/или нейрофибриллярных клубков во взятой у субъекта пробе или у субъекта с соответствующими базовыми значениями. Исходные значения могут представлять собой средние уровни в популяции здоровых людей. Исходные значения могут также представлять собой предшествующие уровни значений, определенные у того же субъекта.

[00197] Описанные выше диагностические способы можно также применять для контроля ответа субъекта на лечение путем обнаружения присутствия фосфорилированного тау у субъекта до, в ходе или после лечения. Уменьшение значений по сравнению с базовыми значениями указывает на положительный ответ на лечение. В биологических жидкостях значения могут также временно возрастать при выводе патологического тау-белка из мозга.

[00198] Настоящая заявка дополнительно относится к созданию набора для выполнения описанных выше способов диагностики и контроля. Как правило, такие наборы содержат диагностический реагент, такой как антитела настоящей заявки, и необязательно детектируемую метку. Диагностическое антитело может само содержать детектируемую метку (например, флуоресцентную молекулу, биотин и т. д.), которая определяется напрямую или с помощью вторичной реакции (например, реакции со стрептавидином). В альтернативном варианте осуществления можно использовать второй реагент, содержащий обнаруживаемую метку, причем второй реагент имеет специфичность связывания с первичным антителом. В диагностическом наборе, приемлемом для измерения уровня РНГ-тау в биологической пробе, антитела набора могут поставляться предварительно связанными с твердой фазой, например с лунками микротитрационного планшета.

## ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00199] В заявке также предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

5

10

15

20

25

30

13, 19, 23 или 59.

[00200] Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка, имеющем аминокислотную последовательность или находящемся внутри аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают парные спиральные филаменты (PHF)-тау, предпочтительно PHF человеческого тау-белка, при этом эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного Т427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435 тау-белка, но не содержит всех из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435.

[00201] Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, содержащие определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7 или 14, 8 и 9 соответственно; причем выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 12 или 18, или вариабельную область легкой цепи, имеющую

полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO:

[00202] Вариант осуществления 2а представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 2, содержащие определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно.

[00203] Вариант осуществления 2b представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 2, содержащие определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 14, 8 и 9 соответственно.

5

10

15

20

25

30

[00204] Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 2, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12 или 18, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, 19, 23 или 59.

[00205] Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–3, содержащие:

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13;
- (b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19;
- (c) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23; или
- (d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 59.

[00206] Вариант осуществления ба представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 6, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13.

[00207] Вариант осуществления 4b представляет собой выделенное гуманизированное антигело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 4, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19.

5

10

15

20

[00208] Вариант осуществления 4с представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 4, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23.

[00209] Вариант осуществления 4d представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 4, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 59.

[00210] Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1—4, содержащие:

- (a) первую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15 или 20;
- (b) две легкие цепи, каждая из которых независимо имеет полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, 21, 24 или 60; и
- (c) вторую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17 или 22.
- [00211] Вариант осуществления 5а представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 5, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, две легкие цепи, имеющие полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, и вторую тяжелую цепь, имеющую
   полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17.
  - [00212] Вариант осуществления 5b представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 5, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, две легкие цепи, имеющие полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 21, и вторую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22.

[00213] Вариант осуществления 5с представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 5, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, две легкие цепи, имеющие полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24, и вторую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17.

[00214] Вариант осуществления 5d представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 5, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, две легкие цепи, имеющие полипептидную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22.

[00215] Вариант осуществления 5е представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–4, содержащие:

- (a) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:
- 61 или 62; и

5

10

15

20

25

30

(b) легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, или 24, или 21, или 60.

[00216] Вариант осуществления 5f представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 5e, содержащие тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 61, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16 или 24.

[00217] Вариант осуществления 5g представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 5e, содержащие тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 62, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21 или 60.

[00218] Вариант осуществления 6 представляет собой конъюгат, содержащий выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по

любому из вариантов осуществления 1–5g, связанные с антителом к CD98 или TfR или его антигенсвязывающим фрагментом.

**[00219]** Вариант осуществления 7 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 6, в котором антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с CD98, предпочтительно человеческим CD98hc или TfR, предпочтительно человеческим TfR1, соответственно с константой диссоциации  $K_D$  по меньшей мере 1 нM, предпочтительно 1–500 нM, при нейтральном pH и константе скорости диссоциации  $k_d$  по меньшей мере  $10^{-4}$  c<sup>-1</sup>, предпочтительно от  $10^{-4}$  до  $10^{-1}$  с<sup>-1</sup> при кислотном pH, предпочтительно pH 5.

5

15

20

10 **[00220]** Вариант осуществления 8 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 6 или 7, в котором антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент имеют константу скорости диссоциации  $k_d$  от  $2 \times 10^{-2}$  до  $2 \times 10^{-4}$  с<sup>-1</sup>, предпочтительно  $8 \times 10^{-3}$  с<sup>-1</sup>, при нейтральном pH.

[00221] Вариант осуществления 9 представляет собой конъюгат по любому из вариантов осуществления 6–8, в котором антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем:

- (a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26, 27, 28 или 33, 29, 30 и 31 соответственно; или
- (b) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела к TfR или его антигенсвязывающего фрагмента имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 401 соответственно.
- 25 [00222] Вариант осуществления 9а представляет собой конъюгат по варианту осуществления 9, в котором антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26, 27 и 28 соответственно, и вариабельную область легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно. [00223] Вариант осуществления 9b представляет собой конъюгат по варианту осуществления 9, в котором антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и

HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26, 27 и 33

соответственно, и вариабельную область легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно.

[00224] Вариант осуществления 9с представляет собой конъюгат по варианту

5

10

15

20

25

30

осуществления 9, в котором антитело к TfR или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36, 36 и 37 соответственно, и вариабельную область легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38, 39 и 40 соответственно.

[00225] Вариант осуществления 10 представляет собой коньюгат по любому из вариантов осуществления 6–9с, в котором антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи, ковалентно связанную с вариабельной областью легкой цепи посредством линкера, причем линкер предпочтительно имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 или 51,

более предпочтительно scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 41.

[00226] Вариант осуществления 10а представляет собой конъюгат по варианту осуществления 10, в котором антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25.

[00227] Вариант осуществления 10b представляет собой конъюгат по варианту осуществления 10, в котором антитело к CD98 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32.

[00228] Вариант 10с осуществления представляет собой конъюгат по варианту 10 осуществления, в котором антитело к TfR или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100%

идентична последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 34.

[00229] Вариант 10d осуществления представляет собой конъюгат по варианту 10 осуществления, в котором антитело к TfR или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 41.

5

10

15

20

25

30

[00230] Вариант осуществления 11 представляет собой слитую конструкцию, содержащую конъюгат по любому из вариантов осуществления 6–10, в которой антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с карбокси-концом только одной из двух тяжелых цепей выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента посредством линкера, причем линкер предпочтительно имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

[00231] Вариант осуществления 12 представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 11, в которой каждая из двух тяжелых цепей выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит одну или более гетеродимерных мутаций, таких как модифицированный гетеродимерный домен СНЗ, или одну или более мутаций «выступ-во-впадину» по сравнению с полипептидом домена СНЗ дикого типа.

[00232] Вариант осуществления 13 представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 12, в которой модифицированный гетеродимерный домен СН3 первой тяжелой цепи содержит аминокислотные модификации в положениях Т350, L351, F405 и Y407, а модифицированный гетеродимерный домен СН3 второй тяжелой цепи содержит аминокислотные модификации в положениях Т350, Т366, К392 и Т394, причем аминокислотная модификация в положении Т350 представляет собой Т350V, T350I, T350L или Т350M; аминокислотная модификация в положении L351 представляет собой L351Y; аминокислотная модификация в положении F405 представляет собой F405A, F405V, F405T или F405S; аминокислотная модификация в положении Y407 представляет собой Y407V, Y407A или Y407I; аминокислотная модификация в положении T366 представляет собой T366L, T366I, T366V или T366M, аминокислотная модификация в положении К392 представляет собой K392F, K392L

или К392М, а аминокислотная модификация в положении Т394 представляет собой

Т394W, и при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу ЕС, как указано в номенклатуре Кабата.

[00233] Вариант осуществления 13а представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 13, в которой модифицированный гетеродимерный домен СН3 первой тяжелой цепи содержит мутации Т350V, L351Y, F405A и Y407V, а модифицированный гетеродимерный домен СН3 второй тяжелой цепи содержит мутации Т350V, T366L, K392L и T394W.

5

10

15

20

25

30

[00234] Вариант осуществления 14 представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 12, в которой модифицированный гетеродимерный домен СН3 первой тяжелой цепи содержит мутацию Т366W, а модифицированный гетеродимерный домен СН3 второй тяжелой цепи содержит мутации Т366S, L368A и Y407V.

[00235] Вариант осуществления 14а представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 14, в которой модифицированный гетеродимерный домен СНЗ второй тяжелой цепи дополнительно содержит мутации H435R и Y436F.

[00236] Вариант осуществления 15 представляет собой слитую конструкцию по любому из вариантов осуществления 11–14а, в которой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более мутаций в Fc-домене, которые усиливают связывание слияния с неонатальным рецептором Fc (RcRn), причем предпочтительно одна или более мутаций усиливают связывание при кислотном pH, более предпочтительно Fc имеет мутации M252Y/S254T/T256E (YTE), при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу EC, как указано в номенклатуре Кабата.

[00237] Вариант осуществления 16 представляет собой слитую конструкцию по любому из вариантов осуществления 11–15, в которой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более мутаций в Fc-домене, которые уменьшают или устраняют эффекторную функцию, причем предпочтительно Fc имеет одну или более аминокислотных модификаций в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329, например одну, две или три мутации L234A, L235A и P331S, при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу EC, как указано в номенклатуре Кабата.

[00238] Вариант осуществления 17 представляет собой слитую конструкцию, содержащую:

- (а) первую тяжелую цепь, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42–49;
- (b) две легкие цепи, каждая из которых независимо на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 21, 24 и 60; и

5

10

15

20

25

30

(c) вторую тяжелую цепь, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17 и 22.

[00239] Вариант осуществления 17а представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. [00240] Вариант осуществления 17b представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. [00241] Вариант осуществления 17с представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. [00242] Вариант осуществления 17d представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. [00243] Вариант осуществления 17е представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, две легкие цепи, каждая из

5

10

15

20

25

30

которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. [00244] Вариант осуществления 17f представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. [00245] Вариант осуществления 17g представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. [00246] Вариант осуществления 17h представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. [00247] Вариант осуществления 17і представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. [00248] Вариант осуществления 17 представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. [00249] Вариант осуществления 17k представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. [00250] Вариант осуществления 171 представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

[00251] Вариант осуществления 17m представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

5

10

15

20

25

30

[00252] Вариант осуществления 17n представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

[00253] Вариант осуществления 17о представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

[00254] Вариант осуществления 17р представляет собой слитую конструкцию по варианту осуществления 17, содержащую первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, две легкие цепи, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

[00255] Вариант осуществления 18 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–5g, конъюгат по любому из вариантов осуществления 6–10d или слитую конструкцию по любому из вариантов осуществления 11–17p.

[00256] Вариант осуществления 19 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 18.

[00257] Вариант осуществления 20 представляет собой клетку-хозяина, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 18 или вектор по варианту осуществления 19.

[00258] Вариант осуществления 21 представляет собой способ получения гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1–5g, конъюгата по любому из вариантов осуществления 6–10 или слитой конструкции по любому из вариантов осуществления 11–17p,

5

10

15

20

25

включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат или слитую конструкцию, в условиях для получения гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции и выделение гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции из клетки или клеточной культуры.

[00259] Вариант осуществления 22 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–5g, конъюгат по любому из вариантов осуществления 6–10d или слитую конструкцию по любому из вариантов осуществления 11–17p и фармацевтически приемлемый носитель.

[00260] Вариант осуществления 23 представляет собой способ блокирования агрегирования тау-белка у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 22.

[00261] Вариант осуществления 24 представляет собой способ индуцирования антителозависимого фагоцитоза (ADP) без стимуляции секреции провоспалительного цитокина у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 22.

[00262] Вариант осуществления 25 представляет собой способ лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 22.

[00263] Вариант осуществления 26 представляет собой способ снижения патологической агрегации тау-белка или распространения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 22.

30 **[00264]** Вариант осуществления 27 представляет собой способ по варианту осуществления 25 или 26, в котором таупатия выбрана из группы, состоящей из наследственной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобновисочной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, болезни

Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, болезни Галлервордена — Шпатца, миозита с тельцами включения, болезни Крейцфельда — Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна — Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками,

5

10

20

25

постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugulistica (деменции боксеров).

[00265] Вариант осуществления 28 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 23–27, в котором фармацевтическую композицию вводят внутривенно.

15 **[00266]** Вариант осуществления 29 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 23–28, в котором фармацевтическую композицию доставляют через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) субъекта.

[00267] Вариант осуществления 30 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 23–29, в котором введение уменьшает Fc-опосредованную эффекторную функцию и/или не вызывает быстрого истощения ретикулоцитов.

[00268] Вариант осуществления 31 представляет собой способ обнаружения наличия РНГ-тау во взятой у субъекта биологической пробе, включающий приведение биологической пробы в контакт с выделенным гуманизированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1–5g и обнаружение связывания гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с РНГ-тау во взятой у субъекта пробе.

[00269] Вариант осуществления 32 представляет собой способ по варианту осуществления 31, в котором биологическая проба представляет собой пробу крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости.

30 **[00270]** Вариант осуществления 33 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–5g, включающий объединение гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

[00271] Вариант осуществления 34 представляет собой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–5g или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 22 для применения в лечении таупатии у нуждающегося в этом субъекта.

[00272] Вариант осуществления 35 представляет собой применение варианта осуществления 34, причем таупатия выбрана из группы, состоящей из наследственной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, болезни Галлервордена — Шпатца, миозита с тельцами включения, болезни Крейцфельда — Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна — Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugulistica (деменции боксеров).

[00273] Вариант осуществления 36 представляет собой применение выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1–5g, конъюгата по любому из вариантов осуществления 6–10d или слитой конструкции по любому из вариантов осуществления 11–17р для изготовления лекарственного средства для лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта.

30 ПРИМЕРЫ

5

10

15

20

25

[00274] Для дополнительной иллюстрации характера изобретения предложены следующие примеры настоящей заявки. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают заявку, и что объем заявки определяется прилагаемой формулой изобретения.

## Пример 1. Получение антител, экспрессия и очистка

Гуманизация мышиного мАт РТ/66 к тау: РТ1В1142

5

10

15

20

25

30

**[00275]** V-области легкой цепи (LC) и тяжелой цепи (HC) РТ/66 (РТ1В585) гуманизировали в формате Fab. Вкратце на зародышевую линию IGKV2-24\*01 человека прививали области CDR  $V_L$  (определение AbM) из PT/66 и два положения F41L и S28P (в соответствии с системой нумерации по Кабату) идентифицировали как обратные мутации человек-мышь. На зародышевую линию IGHV1-18\*01 человека прививали области CDR  $V_H$  из PT/66 и одно положение A40R идентифицировали как обратную мутацию человек-мышь. Кроме того, области CDR  $V_L$  и  $V_H$  прививали на упомянутые выше зародышевые линии человека без обратных мутаций человек-мышь (РТ1В995). Один вариант Fab, содержащий все три мутации, представлял собой PT1В1142, а его полная версия IgG человека представляла собой PT1В1153. 2-ю каркасную область в легкой цепи PT1В1153 модифицировали с получением другого гуманизированного антитела PT1В1183. ППР-сенсограмма связывания PT1В1183 с полноразмерным рекомбинантным тау-белком показана на Фиг. 4.

Связывание гуманизированного варианта PT/66 Fab PT1B1142 с рекомбинантным тау-белком

[00276] Гуманизированные варианты PT/66 экспрессировали в  $E.\ coli$ , а затем проверяли на связывание с рекомбинантным полноразмерным тау-белком и термостабильность. Вкратце кодирующие Fab последовательности клонировали в вектор vDR001246 (Antibody Design Labs, г. Сан-Диего, штат Калифорния), имеющий лидерные последовательности PelB и OmpA для секреции тяжелых и легких цепей соответственно. Клетки E. coli (штамм MC1061) трансформировали плазмидами и выращивали в течение ночи при 37 °C в среде для выращивания микроорганизмов 2хҮТ с добавлением 100 мкг/мл карбенициллина. Выращенные в течение ночи культуры использовали для инокуляции экспрессионных культур объемом 0,5 мл и выращивали при 37 °C до OD600 ~ 2,0. Экспрессию белка индуцировали добавлением 1 мМ IPTG и культуры выращивали в течение ночи при 30 °С. После экспрессии клетки гранулировали центрифугированием при 3500 Х g в течение 10 мин, а супернатанты собирали и исследовали непосредственно с помощью ИФА. Для ИФА биотинилированный полноразмерный тау-белок иммобилизовали на планшете в концентрациях от 0,039 мкг/мл до 2,5 мкг/мл в двукратных разведениях с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 45 мин. Планшеты блокировали с помощью 1 x PBS-Tween с добавлением 3% молока. Планшеты промывали с помощью

1 х PBS-Tween. В каждый планшет добавляли супернатант и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Связанный Fab обнаруживали с использованием GoatAnitFab'2-пероксидазы хрена, разбавленной 1 : 5000 при 50 мкл на лунку, а затем обнаруживали с помощью субстрата хемилюминесценции (Sigma, кат. № 11582950001).

Все протестированные молекулы Fab, полученные из PT/66, связывали полноразмерный тау-белок. Кривые связывания для PT1B1142 по сравнению с PT/66 и PT1B995 показаны на Фиг. 1.

Определение термической стабильности гуманизированных вариантов Fab

5

10

15

20

25

[00277] Термическую стабильность гуманизированных вариантов РТ/66 определяли с помощью ИФА при термической обработке. Анализ экспрессии и ИФА проводили, как описано выше (связывание). Однако супернатант экспрессии каждого варианта разделяли на четыре (4) аликвоты. Одну аликвоту хранили при комн. темп., а другие три нагревали до 60 °C, 65 °C и 70 °C соответственно и затем охлаждали до комнатной температуры. С помощью ИФА получали (в трех повторностях) сигналы связывания для всех четырех образцов. Сигналы связывания при повышенных температурах, выраженные в виде отношения к сигналу при комн. темп., отражали термостабильность вариантов (таблица 1 и Фиг. 2).

**Таблица 1.** Сигналы связывания при повышенных температурах, выраженные в виде отношения к сигналу при комн. темп., отражают термостабильность вариантов

		Процент связывания, сохраняемый при		
Название белка АА	Средний объем при комн. темп.	60 °C	65 °C	70 °C
PT1B1141	3681333	98	107	84
PT1B1142	5251067	102	103	77
PT1B995	3761333	94	99	71
PT1B585 (PT/66)	586800	62	11	6

Гуманизация мышиного мАт РТ/66 к тау: РТ1В635 и РТ1В901

[00278] В отдельном эксперименте РТ/66 гуманизировали с использованием различных акцепторных человеческих каркасных областей. Вкратце области CDR  $V_L$  из РТ/66 прививали на зародышевую линию IGKV2D-40\*01 человека, а области CDR  $V_H$  прививали на зародышевую линию IGHV1–18\*01 человека. Обратных мутаций в легкой цепи не было. Однако два положения в  $V_L$ , M70L и T72V (система нумерации по Кабату), были идентифицированы как обратные мутации человек-мышь. Гуманизированный вариант получил название РТ1В635. Кроме того, LC из РТ/66

содержала DG (положения 43–44 в CDR1) мотив, который представлял риск для изомеризации. Этот риск был ослаблен за счет создания варианта, содержащего мутацию G44L. Данный вариант представляет собой PT1B901. PT1B635 и PT1B901 тестировали на связывание с рекомбинантным тау-белком посредством ППР.

## 5 Экспрессия и очистка антител

10

15

20

25

[00279] Материал высокой чистоты экспрессировали в небольшом масштабе (2 мл) в клетках ЕхріСНО путем временной трансфекции очищенными плазмидными ДНК, кодирующими РТ1В635 и РТ1В901. Трансфицированные клетки инкубировали при 37 °С в течение семи дней перед сбором супернатанта культуры. Собранный супернатант осветляли центрифугированием и затем фильтровали. Супернатант клеточной культуры очищали с использованием аффинной хроматографии с белком-А MabSelectSuRe и конечный элюент, содержащий мономерный белок (в трис-ацетатном буфере), диализовали в dPBS 7,2. Концентрацию очищенного белка определяли по абсорбции на 280 нм на спектрофотометре NanoDrop, а качество оценивали с помощью аналитической эксклюзионной ВЭЖХ. Чистота конечного продукта составляла > 98%, и его использовали для последующих исследований. Следующие гуманизированные антитела были экспрессированы и очищены.

Таблица 1а. Гуманизированные антитела к тау-белку и их последовательности

	PT1B901	PT1B1153	PT1B635	PT1B1183
		(PT1B1142)		
HCDR1-	SEQ ID NO: 4, 5	SEQ ID NO: 4, 5 и	SEQ ID NO: 4, 5	SEQ ID NO: 4, 5 и
3	и 6	6	и 6	6
LCDR1-	SEQ ID NO: 14,	SEQ ID NO: 7, 8 и	SEQ ID NO: 7, 8	SEQ ID NO: 7, 8 и
3	8и9	9	и 9	9
VHиVL	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 18 и	SEQ ID NO: 12 и	SEQ ID NO: 18 и
	и 13	19	23	59
HC и LC	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 62 и	SEQ ID NO: 61 и	SEQ ID NO: 62 и
	и 16	21	24	60
HC1, LC	SEQ ID NO: 15,	SEQ ID NO: 20, 21	SEQ ID NO: 15,	SEQ ID NO: 20, 60
и НС2	16 и 17	и 22	24 и 17	и 22

# <u>Пример 2.</u> Характеристика связывания антител к тау-белку с рекомбинантным тау-белком посредством ППР

[00280] Взаимодействия антител к тау-белку с полноразмерным рекомбинантным тау-белком (2N4R) изучали посредством ППР с использованием Віасоге Т200 при 25 °C с буфером HBS рН 7,4, добавлением 3 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) и 0,05% Тween 20. Вкратце поверхность биодатчика готовили путем связывания смеси специфических антител к Fcγ-фрагменту мышиного/человеческого IgG с поверхностью

сенсорного чипа СМ4 с использованием инструкций производителя по химии связывания аминов (> 4000 отвечающих единиц (RU)). Связывающий буфер представлял собой 10 мМ ацетат натрия с рН 4,5. Антитела к тау-белку разводили в рабочем буфере и вводили для получения достаточного захвата, позволяющего обнаруживать связывание антигена. После захвата антител мАт к тау-белку проводили инъекцию растворов рекомбинантно экспрессированного тау-белка в диапазоне от 0,12 нМ до 75 нМ при 5-кратных разведениях. Ассоциацию и диссоциацию контролировали в течение 3 минут и 60 мин соответственно при скорости потока 50 мкл/мин. Регенерацию поверхности датчика выполняли с помощью 0,85% Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub>. Сенсограммы связывания аппроксимировали с использованием модели связывания Ленгмюра 1 : 1 с получением значений скорости ассоциации, скорости диссоциации и аффинностей. РТ1В635 и РТ1В901 связывались с полноразмерным тау-белком с такими же тесными аффинностями, как и родительские мАт, РТ/66 или РТ1В545 (Фиг. 3 и таблица 2 ниже).

5

10

25

**Таблица 2.** Кинетика связывания и аффинность гуманизированных антител РТ66 к рекомбинантному тау-белку, полученные посредством ППР

МАт	Описание	kon (1/M*c)	$k_{off}$ (1/c)	<b>К</b> <sub>D</sub> (пМ)
PT/66	мышиное	4,5E + 05	< 1,42E-05*	< 31
	родительское			
PT1B545	рек. родительское	5,1E + 05	<1,42E-05*	< 28
PT1B635	гуманизированное	3,7E + 05	<1,42E-05*	< 41
PT1B901	гуманизированное	3,0E + 05	2,0E-05	59
PT1B1183	Гуманизированное	1,99E + 06	1,19E-05**	< 6,18

 $k_{off}$  на основе 1-часового ограничения\* или 2-часового ограничения\*\* и в предположении 5%-й диссоциации. Соответствующие аффинности представлены как «более тесные».

## 20 Пример 3. Функциональное тестирование с помощью иммунодеплеции

[00281] Чтобы исследовать, относится ли значение ингибирования максимального процентного содержания к плотности эпитопов на агрегатах тау-белка при БА или к количеству агрегатов, содержащих эпитоп РТ/66, гуманизированные варианты РТ/66 будут протестированы на ингибирование агрегирования тау-белка в анализе иммунодеплеции. В этом анализе было показано, что родительское мышиное антитело

РТ/66 истощает > 90% агрегатов тау-белка (см. US 63/166,439, содержание которого полностью включено в настоящий документ). Гомогенаты для иммунодеплеции, содержащие агрегаты тау-белка, могут быть получены из спинного мозга трансгенных животных РЗ01S в возрасте от 22 до 23 недель или из криоконсервированной ткани головного мозга человека с БА. Биохимический анализ иммуноистощенных образцов проводили с помощью самосэндвич-анализов MSD hTau60/hTau60 и/или РТ/66/РТ/66, которые очень хорошо коррелируют с анализом клеточного засеивания (см., например, US 63/166,439). В последнем используют клетки НЕК, экспрессирующие два фрагмента К18 тау-белка с метками хромофора, которые генерируют сигнал при нахождении в непосредственной близости посредством агрегации. При обработке клеток агрегатами агрегированных и фосфорилированных полноразмерных тау-белков, полученными из разных источников, индуцируется агрегат К18, который можно количественно определить подсчетом клеток, положительных по резонансному переносу энергии флуоресценции (FRET), с использованием активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) (Holmes et al., 2014, PNAS, 111(41): E4376-85).

[00282] Агрегаты тау-белка при БА будут инкубированы с тестовым антителом и удалены из раствора гранулами белка G. Истощенный супернатант будет протестирован на остаточные агрегаты тау-белка с использованием самосэндвичанализов MSD PT/66/PT/66. Это подтвердит, являются ли гуманизированные версии PT/66 такими же эффективными, как и родительское мАт PT/66, в истощении агрегатов тау-белка при БА.

#### Пример 4. Слитые конструкции

5

10

15

20

25

30

Конфигурация слитой конструкции

[00283] Слитые конструкции, содержащие слияние антигенсвязывающего фрагмента (scFv) антитела к CD98hc или huTfR и гуманизированного антитела к PHF-тау (тау-Ат), разработаны для обеспечения возможности проникновения тау-Ат через ГЭБ, что приводит к значительно более высоким концентрациям в головном мозге по сравнению с одним только тау-Ат.

[00284] Например, слитая конструкция содержит гуманизированное тау-Ат и scFv, связывающий CD98hc или huTfR, присоединенный к C-концу одной тяжелой цепи антитела гуманизированного тау-белка с использованием короткого гибкого линкера. Слитые конструкции анализируют на предмет следующих характеристик, которые были описаны ранее для усиления трансцитоза (рассмотрено в Goulatis and Shusta

2017): валентность, аффинность связывания, рН-зависимое связывание и быстрая интернализация в эндотелиальных клетках головного мозга.

[00285] Вариабельные последовательности тяжелой и легкой цепей антитела к CD98hc или huTfR сливают в единую генетическую конструкцию в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), используя следующий формат:

Hc\_GGGSGGGCPPCGGSGG (SEQ ID NO: 50)\_Lc или Hc GTEGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 51 Lc

[00286] Затем scFv к CD98hc или huTfR сливают с C-концом одной тяжелой цепи (Hc) гуманизированного тау-Ат с использованием линкера GGAGGA (SEQ ID NO: 52).

Мутации гетеродимеризации «выступ-во-впадину» в СНЗ используются в антителе Нс (Нс А выступ: Т366W; Нс В впадина: Т366S\_L368A\_Y407V) для создания слитой конструкции. Кроме того, двойная мутация RF (H435R\_Y436F) в СНЗ используется на Нс В для разрушения связывания белка А и удаления гомодимеров «впадина-впадина» во время очистки. Слитая конструкция содержит две легкие цепи с идентичной аминокислотной последовательностью и две тяжелые цепи с разными аминокислотными последовательностями. Только одна из двух тяжелых цепей слита с scFv антитела к CD98 или TfR, а две тяжелые цепи также отличаются своими константными областями для облегчения гетеродимеризации между двумя тяжелыми цепями. Таким образом, каждая слитая конструкция в соответствии с вариантом осуществления настоящей заявки связана с тремя аминокислотными

последовательностями: аминокислотной последовательностью первой тяжелой цепи, слитой с антигенсвязывающим фрагментом антитела к CD98 или TfR, аминокислотной последовательностью легкой цепи и аминокислотной последовательностью второй тяжелой цепи, не слитой с антигенсвязывающим фрагментом антитела к CD98 или TfR.

25 Экспрессия, очистка и характеризация

5

10

15

20

[00287] Слитые конструкции экспрессируют в клетках СНО-Ехрі и очищают с использованием аффинной хроматографии на белке А с последующим эксклюзионной хроматографией или ионообменной хроматографией.

[00288] Примеры полученных слитых конструкций представлены в таблице 3.

## 30 Таблица 3. Молекулы тау-ГЭБ

Название	мАт к тау- белку	scFv, ГЭБ	Последовательности HC1, LC и HC2
BBBB1910	PT1B1183	TFRB321 (антитело к TfR)	SEQ ID NO: 43, 60 и 22

BBBB1909	PT1B1183	TFRB320 (антитело к TfR)	SEQ ID NO: 45, 60 и 22
BBBB1626	PT1B901	TFRB321 (антитело к TfR)	SEQ ID NO: 42, 16 и 17
BBBB1625	PT1B635	TFRB321 (антитело к TfR)	SEQ ID NO: 42, 24 и 17
BBBB1624	PT1B1153	TFRB321 (антитело к TfR)	SEQ ID NO: 43, 21 и 22
BBBB1622	PT1B901	TFRB320 (антитело к TfR)	SEQ ID NO: 44, 16 и 17
BBBB1621	PT1B635	TFRB320 (антитело к TfR)	SEQ ID NO: 44, 24 и 17
BBBB1620	PT1B1153	TFRB320 (антитело к TfR)	SEQ ID NO: 45, 21 и 22
BBBB1548	PT1B901	C98B72 (антитело к CD98hc)	SEQ ID NO: 46, 16 и 17
BBBB1546	PT1B901	C98B73 (антитело к CD98hc)	SEQ ID NO: 47, 16 и 17
BBBB1545	PT1B635	C98B72 (антитело к CD98hc)	SEQ ID NO: 46, 24 и 17
BBBB1543	PT1B635	C98B73 (антитело к CD98hc)	SEQ ID NO: 47, 24 и 17
BBBB1508	PT1B1153	C98B72 (антитело к CD98hc)	SEQ ID NO: 48, 21 и 22
BBBB1506	PT1B1153	С98В73 (антитело к СD98hc)	SEQ ID NO: 49, 21 и 22
BBBB1505	PT1B1183	C98B72 (антитело к CD98hc)	SEQ ID NO: 48, 60 и 22
BBBB1503	PT1B1183	C98B73 (антитело к CD98hc)	SEQ ID NO: 49, 60 и 22

[00289] Характеристики связывания и функциональное тестирование с помощью иммунодеплеции определяют для слитых конструкций с использованием способов, аналогичных описанным в примерах 2 и 3 выше.

## 5 Интернализация

10

[00290] Эндотелиальные клетки головного мозга человека (hCMECD3) высевали в количестве 10 000 клеток/лунку в покрытые коллагеном 384-луночные планшеты Cell Carrier Ultra (Perkin Elmer) и оставляли для прикрепления на 16 часов при 37 °C в увлажненном инкубаторе. Затем клетки (50 000 клеток) инкубировали с очищенной слитой конструкцией в концентрации 200 мкг/мл и оставляли инкубироваться при 37 °C на один час. Клетки фиксировали, промывали и инкубировали с флуоресцентномеченым вторичным антителом в течение одного часа. Затем клетки снова промывали и инкубировали с флуоресцентно меченым актиновым красителем, фаллоидиновым и

ядерным красителем, Hoeschst 33342. Клетки снова промывали и визуализировали с использованием устройства ImageXpress Micro (Molecular Devices) с 40-кратным объективом. Интернализирующие конструкции идентифицировали на основе колокализации с фаллоидином, используя MetaXpress 6.0.

5

10

15

20

25

30

[00291] Чтобы оценить потенциал слитой конструкции по стимулированию поглощения агрегатов тау-белка в клетке микроглии, микроглию человека, полученную из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток(iPSC), высевали на 384луночные планшеты Perkin Elmer Cell Ultra при разведении 7000 клеток на планшет и поддерживали в усовершенствованной среде DMEM/F12 с Glutamax+, пенициллином/стрептомицином, IL34 (100 нг/мл) и GMCSF (10 нг/мл). В день анализа биотинилированным тау-олигомерам давали возможность образовать комплекс со стрептавидином Alexa Flour 488 (AF488) при 15-кратном молярном избытке. Затем меченым тау-олигомерам давали возможность связать тестируемые конструкции при примерно двукратном молярном избытке при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем олигомерный комплекс Ат: тау доставляли в микроглию по 20 мкл/лунку. Через 2, 4 и 8 часов после инкубации клетки дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (РВЅ) и фиксировали в присутствии 4% параформальдегида в течение 15 минут при комнатной температуре. После фиксации клетки снова дважды промывали PBS и инкубировали в течение ночи с первичным антителом LAMP1, маркером для лизосом, в концентрации 4 мкг/мл в буфере пермеабилизации (0,1% сапонина + 1% желатина рыбьей кожи) при 4 °C. После инкубации клетки дважды промывали PBS и окрашивали вторичным антителом в концентрации 1 мкг/мл, конъюгированным с Alexa flour 647, в буфере пермеабилизации в течение 1 часа при 4 °С. После инкубации клетки дважды промывали PBS, переокрашивали с использованием красителя ДНК Хехста в концентрации 1 мкг/мл в течение 10 минут при комнатной температуре в PBS. Затем клетки в последний раз промывали PBS, ресуспендировали в 20 мкл PBS на лунку и визуализировали на конфокальном микроскопе Opera Phenix с большим количеством изображений. Полученные изображения анализировали с использованием программного обеспечения Harmony and ImageJ analysis. Приблизительно 500 клеток в каждом состоянии оценивают на наличие тау-олигомеров в фаголизосомных структурах, меченных антителом LAMP1. Слитые конструкции сравнивали с антителами тау-Ат на предмет поглощения фагосомами. [00292] Хотя варианты осуществления изобретения описаны подробно и со ссылкой

на его конкретные варианты осуществления, рядовому специалисту в данной области

будет очевидно, что в него могут быть внесены различные изменения и модификации без отступления от сущности и объема изобретения.

## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Эпитоп PHF-тау, SEQ ID NO: 1 SPQLATLADEVSASLAK

5 <u>Антитела к РНГ-тау</u> Области CDR подчеркнуты

> PT/66 моноклональное AT к PHF-тау VH PT1B545, SEQ ID NO: 2

10 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKAS<u>GYTFTSYWIT</u>WVKQRPGQGLEWIG<u>DIHPGRG</u> <u>STK</u>SNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCAR<u>RWGFDY</u>WGQGTTLT VSS

**VL PT1B545, SEQ ID NO: 3** 

15 DIVITQDELSNPVTSGESVSISC<u>RSSKSLLYKDGKTYLN</u>WFLQRPGQSPQLLIY<u>LMSTR</u> <u>AS</u>GVSDRFSGSGSGTDFTLEISRVKAEDVGVYYC<u>QQLVDYPLT</u>FGAGTKLELK

HCDR1 PT1B545, SEQ ID NO: 4 GYTFTSYWIT

20

HCDR2 PT1B545, SEQ ID NO: 5 DIHPGRGSTK

**HCDR3 PT1B545, SEQ ID NO: 6** 

25 RWGFDY

LCDR1 PT1B545, SEQ ID NO: 7 RSSKSLLYKDGKTYLN

30 LCDR2 PT1B545, SEQ ID NO: 8 LMSTRAS

LCDR3 PT1B545, SEQ ID NO: 9 QQLVDYPLT

35

**HC PT1B545, SEQ ID NO: 10** 

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYWITWVKQRPGQGLEWIGDIHPGRG STKSNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCARRWGFDYWGQGTTLT VSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPA 40 VLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAP NLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQT HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY FMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

45

LC PT1B545, SEO ID NO: 11

50 DSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

## Гуманизированное Ат РТ1В901 VH PT1B901, SEO ID NO: 12

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR 5 <u>GSTK</u>YAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR<u>RWGFDY</u>WGQGTL **VTVSS** 

## **VL PT1B901, SEQ ID NO: 13**

DIVITQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDLKTYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTRA <u>S</u>GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIK

HCDR1 PT1B901, SEQ ID NO: 4 **GYTFTSYWIT** 

15 HCDR2 PT1B901, SEQ ID NO: 5 **DIHPGRGSTK** 

> HCDR3 PT1B901, SEQ ID NO: 6 **RWGFDY**

20

10

**LCDR1 PT1B901, SEQ ID NO: 14** RSSKSLLYKDLKTYLN

LCDR2 PT1B901, SEQ ID NO: 8

25 **LMSTRAS** 

> LCDR3 PT1B901, SEQ ID NO: 9 **QQLVDYPLT**

#### 30 HC1 PT1B901, SEQ ID NO: 15

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAOKLOGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGOGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP

35 CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG **QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL** DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

#### 40 LC1/2 PT1B901, SEQ ID NO: 16

DIVITQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDLKTYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

45

#### HC2 PT1B901, SEQ ID NO: 17

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF

50 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

5

## HC PT1B901, SEQ ID NO: 61

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15

10

## Гуманизированное AT PT1B1153 VH PT1B1153, SEQ ID NO: 18

 $QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS\underline{GYTFTSYWIT}WVRQRPGQGLEWMG\underline{DIHPGR}\\\underline{GSTK}YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR\underline{RWGFDY}WGQGTL$ 

20 VTVSS

#### **VL PT1B1153, SEQ ID NO: 19**

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC<u>RSSKSLLYKDGKTYLN</u>WLQQRPGQPPRLLIY<u>LMST</u> <u>RAS</u>GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC<u>QQLVDYPLT</u>FGQGTKLEIK

25

HCDR1 PT1B1153, SEQ ID NO: 4 GYTFTSYWIT

**HCDR2 PT1B1153, SEQ ID NO: 5** 

30 DIHPGRGSTK

HCDR3 PT1B1153, SEQ ID NO: 6 RWGFDY

35 **LCDR1 PT1B1153, SEQ ID NO:** 7 RSSKSLLYKDGKTYLN

LCDR2 PT1B1153, SEQ ID NO: 8 LMSTRAS

40

LCDR3 PT1B1153, SEQ ID NO: 9 QQLVDYPLT

#### HC1 PT1B1153, SEQ ID NO: 20

45 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH 50 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## LC1/2 PT1B1153, SEQ ID NO: 21

5 DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWLQQRPGQPPRLLIYLMST RASGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## 10 **HC2 PT1B1153, SEQ ID NO: 22**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP

15 CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

## 20 HC PT1B1153, SEQ ID NO: 62

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP

25 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

## Гуманизированное Ат РТ1В635

**VH PT1B635, SEQ ID NO: 12** 

 $QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS\underline{GYTFTSYWIT}WVRQAPGQGLEWMG\underline{DIHPGR}\\\underline{GSTK}YAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR\underline{RWGFDY}WGQGTL$ 

35 VTVSS

## **VL PT1B635, SEQ ID NO: 23**

DIVITQTPLSLPVTPGEPASISC<u>RSSKSLLYKDGKTYLN</u>WFLQKPGQSPQLLIY<u>LMSTR</u> <u>AS</u>GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC<u>QQLVDYPLT</u>FGQGTKLEIK

40

HCDR1 PT1B635, SEQ ID NO: 4
GYTFTSYWIT

**HCDR2 PT1B635, SEQ ID NO: 5** 

45 DIHPGRGSTK

HCDR3 PT1B635, SEQ ID NO: 6 RWGFDY

50 **LCDR1 PT1B635, SEQ ID NO:** 7

#### RSSKSLLYKDGKTYLN

LCDR2 PT1B635, SEQ ID NO: 8 LMSTRAS

5

50

LCDR3 PT1B635, SEQ ID NO: 9 QQLVDYPLT

#### HC1 PT1B635, SEQ ID NO: 15

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## LC1/2 PT1B635, SEQ ID NO: 24

20 DIVITQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTR ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## 25 **HC2 PT1B635, SEQ ID NO: 17**

 $QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR\\GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL\\VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF\\PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP$ 

30 CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

## 35 HC PT1B635, SEQ ID NO: 61

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP

40 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## 45 <u>Последовательности scFv к CD98 и TfR</u> Области CDR подчеркнуты; линкер scFv выделен курсивом

#### C98B72 (scFv κ CD98hc), SEQ ID NO: 25

>TPP000231088|C98B72|зрелый\_scFv| C98B72 (антитело к CD98hc) scFv-HL [16-аа модифицированный линкер Берда]

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA<u>IISYDGS</u>
NKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>APSSFYFDY</u>WGQGT
LVTVSSGTEGKSSGSGSESKSTDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC<u>KSSQSVLFSSNNKNY</u>
LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ
QYYSTPPTFGQGTKVVIK

HCDR1 C98B72, SEQ ID NO: 26 GFTFSSYGMH

10 **HCDR2 C98B72, SEQ ID NO: 27** IISYDGSNKH

HCDR3 C98B72, SEQ ID NO: 28 APSSFYFDY

15

5

LCDR1 C98B72, SEQ ID NO: 29 KSSQSVLFSSNNKNYLA

**LCDR2 C98B72, SEQ ID NO: 30** 

20 WASTRES

LCDR3 C98B72, SEQ ID NO: 31

**QQYYSTPPT** 

#### C98B73 (scFv к CD98hc), SEQ ID NO: 32

>TPP000231089|C98B73|зрелый\_scFv| C98B73 (антитело к CD98hc) scFv-HL [16-аа модифицированный линкер Берда]
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA<u>IISYDGS NKH</u>YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>APSHFYFDY</u>WGQGT LVTVSSGTEGKSSGSGSESKSTDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC<u>KSSQSVLFSSNNKNY LA</u>WYQQKPGQPPKLLIY<u>WASTRES</u>GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QYYSTPPTFGQGTKVVIK

HCDR1 C98B73, SEQ ID NO: 26 GFTFSSYGMH

35

HCDR2 C98B73, SEQ ID NO: 27 IISYDGSNKH

**HCDR3 C98B73, SEQ ID NO: 33** 

40 APSHFYFDY

LCDR1 C98B73, SEQ ID NO: 29 KSSQSVLFSSNNKNYLA

45 **LCDR2 C98B73, SEQ ID NO: 30** WASTRES

LCDR3 C98B73, SEQ ID NO: 31 QQYYSTPPT

## TFRB321 (scFv κ TfR) SEQ ID NO: 34

>TPP000231087|TFRB321|зрелый\_scFv| TFRB321 (антитело к TfR) spFv-HL [сшитый линкер]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCADSGFTFSSYAMNWVRQAPGCGLEWVSGISGSGG

HTYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYDSSGYNPFDY
WGQGTQVTVSSGGGSGGCPPCGGSGGSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLG
DKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADY
YCQAWDSSTVVFGCGTKLTVL

10 **HCDR1 TFRB321, SEQ ID NO: 35** GFTFSSYAMN

**HCDR2 TFRB321, SEQ ID NO: 36** GISGSGGHTY

15

HCDR3 TFRB321, SEQ ID NO: 37 EGYDSSGYNPFDY

LCDR1 TFRB321, SEQ ID NO: 38

20 SGDKLGDKYAS

LCDR2 TFRB321, SEQ ID NO: 39 QDSKRPS

25 **LCDR3 TFRB321, SEQ ID NO: 40** QAWDSSTVV

#### TFRB320 (scFv κ TfR) SEQ ID NO: 41

>TPP000231086|TFRB320|зрелый\_scFv| TFRB320 (антитело к TfR) scFv-HL [16-аа модифицированный линкер Берда] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCADSGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISGSGG

HTYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYDSSGYNPFDY WGQGTQVTVSSGTEGKSSGSGSESKSTSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYA SWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA

35 WDSSTVVFGGGTKLTVL

HCDR1 TFRB320, SEQ ID NO: 35 GFTFSSYAMN

40 **HCDR2 TFRB320, SEQ ID NO: 36** GISGSGGHTY

HCDR3 TFRB320, SEQ ID NO: 37 EGYDSSGYNPFDY

45

30

LCDR1 TFRB320, SEQ ID NO: 38 SGDKLGDKYAS

LCDR2 TFRB320, SEQ ID NO: 39

50 QDSKRPS

## LCDR3 TFRB320, SEQ ID NO: 40 QAWDSSTVV

5 Конъюгаты анти-тау-ГЭБ

ScFV подчеркнут; линкер привязки Hc scFv выделен курсивом

#### **BBBB1910**

>BBBB1910|тяжелая цепь 1| **SEQ ID NO: 43** 

- 10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
- 15 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGAGGAE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCADSGFTFSSYAMNWVRQAPGCGLEWVSGISGSGGH TYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYDSSGYNPFDYW
- 20 <u>GQGTQVTVSSGGGSGGSGGCPPCGGSGGSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDK</u> <u>YASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC</u> <u>QAWDSSTVVFGCGTKLTVL</u>

>BBBB1910|легкая\_цепь\_1/2| **SEQ ID NO: 60** 

- 25 DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLMSTR ASGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- >BBBB1910|тяжелая\_цепь\_2| SEQ ID NO: 22
  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR
  GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
  VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
  PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
  CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
  NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
  QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
  DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

#### 40 **BBBB1909**

>BBBB1909|тяжелая\_цепь\_1| **SEQ ID NO: 45**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF

45 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGAGGAE* 

VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCADSGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGH TYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYDSSGYNPFDYW GQGTQVTVSSGTEGKSSGSGSESKSTSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYA SWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSSTVVFGGGTKLTVL

>BBBB1909|легкая\_цепь\_1/2| **SEQ ID NO: 60**DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLMSTR
ASGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>BBBB1909|тяжелая\_цепь\_2| **SEQ ID NO: 22**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR
15 GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
20 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

#### **BBBB1626**

5

10

>BBBB1626|тяжелая цепь 1| **SEQ ID NO: 42** 

- 25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH 30 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG OPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGAGGA*E VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCADSGFTFSSYAMNWVRQAPGCGLEWVSGISGSGGH TYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYDSSGYNPFDYW 35 GQGTQVTVSSGGGSGGSGGCPPCGGSGGSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDK YASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC **QAWDSSTVVFGCGTKLTVL** 
  - >BBBB1626|легкая цепь 1/2| **SEQ ID NO: 16**
- 40 DIVITQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDLKTYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- >BBBB1626|тяжелая\_цепь\_2| SEQ ID NO: 17 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP

CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

5

10

15

25

#### **BBBB1625**

>BBBB1625|тяжелая\_цепь\_1| **SEQ ID NO: 42**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGAGGAE*VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCADSGFTFSSYAMNWVRQAPGCGLEWVSGISGSGGH
TYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYDSSGYNPFDYW
GQGTQVTVSSGGGSGGSGGCPPCGGSGGSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDK
YASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC

20 <u>QAWDSSTVVFGCGTKLTVL</u>

>BBBB1625|легкая\_цепь\_1/2| **SEQ ID NO: 24**DIVITQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTR
ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>BBBB1625|тяжелая\_цепь\_2| **SEQ ID NO: 17**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR
30 GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

## **BBBB1624**

>BBBB1624|тяжелая цепь 1| **SEQ ID NO: 43** 

40 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
VAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGAGGAE
VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCADSGFTFSSYAMNWVRQAPGCGLEWVSGISGSGGH
TYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYDSSGYNPFDYW
S0 GOGTOVTVSSGGGSGGSGGCPPCGGSGGSYELTOPPSVSVSPGOTASITCSGDKLGDK

## YASWYOOKPGOSPVLVIYODSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTOAMDEADYYC **QAWDSSTVVFGCGTKLTVL**

>BBBB1624|легкая цепь 1/2| **SEQ ID NO: 21** 

- 5 DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWLQQRPGQPPRLLIYLMST RASGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- 10 >BBBB1624|тяжелая цепь 2| **SEQ ID NO: 22** OVOLVOSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRORPGOGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP 15 CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWOOGNVFSCSVMHEALHNRFTOKSLSLSPGK

#### 20 **BBBB1622**

>BBBB1622|тяжелая цепь 1| **SEQ ID NO: 44** OVOLVOSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVROAPGOGLEWMGDIHPGR GSTKYAOKLOGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGOGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF

- 25 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG **QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL** DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGAGGA*<u>E</u>
- 30 VOLLESGGGLVOPGGSLRLSCADSGFTFSSYAMNWVROAPGKGLEWVSGISGSGGH TYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYDSSGYNPFDYW GQGTQVTVSSGTEGKSSGSGSESKSTSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYA SWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSSTVVFGGGTKLTVL

35 >BBBB1622|легкая цепь 1/2| **SEQ ID NO: 16** DIVITQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDLKTYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCOOLVDYPLTFGOGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD 40 STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>BBBB1622|тяжелая цепь 2| **SEQ ID NO: 17** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL

- 45 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTOTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG **QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**
- 50 DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

#### **BBBB1621**

>BBBB1621|тяжелая цепь 1| **SEQ ID NO: 44** 

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR 5 GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG 10 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGAGGA*E VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCADSGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGH TYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYDSSGYNPFDYW <u>GQGTQVTVSSGTEGKSSGSGSESKSTSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYA</u> 15 SWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSSTVVFGGGTKLTVL

>BBBB1621|легкая цепь 1/2| **SEQ ID NO: 24** 

DIVITQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTR
20 ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>BBBB1621|тяжелая цепь 2| **SEQ ID NO: 17** 

 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

## **BBBB1620**

35 >BBBB1620|тяжелая цепь 1| **SEQ ID NO: 45** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP 40 CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG **QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL** DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGAGGA*E <u>VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCADSGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGH</u> 45 TYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYDSSGYNPFDYW GQGTQVTVSSGTEGKSSGSGSESKSTSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYA <u>SWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA</u> WDSSTVVFGGGTKLTVL

>BBBB1620|легкая цепь 1/2| **SEQ ID NO: 21** 

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWLQQRPGQPPRLLIYLMST RASGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>BBBB1620|тяжелая\_цепь\_2| **SEQ ID NO: 22**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL

DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

#### **BBBB1548**

5

10

15

>BBBB1548|тяжелая цепь 1| **SEQ ID NO: 46** 

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGAGGAQ
VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSN
KHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPSSFYFDYWGQGTL
VTVSSGTEGKSSGSGSESKSTDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNY
LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ

**QYYSTPPTFGQGTKVVIK** 

DIVITQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDLKTYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>BBBB1548|тяжелая цепь 2| **SEQ ID NO: 1**7

>BBBB1548|легкая цепь 1/2| **SEQ ID NO: 16** 

40 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

45 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

#### **BBBB1546**

50 >BBBB1546|тяжелая цепь 1| **SEQ ID NO: 4**7

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP

5 CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGAGGAQ
VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSN

KHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPSHFYFDYWGQGTL
VTVSSGTEGKSSGSGSESKSTDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNY
LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ
QYYSTPPTFGQGTKVVIK

>BBBB1546|легкая\_цепь\_1/2| **SEQ ID NO: 16**DIVITQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDLKTYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

>BBBB1546|тяжелая\_цепь\_2| **SEQ ID NO: 17**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
25
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

#### **BBBB1545**

QYYSTPPTFGQGTKVVIK

30

35

40

45

>BBBB1545|тяжелая\_цепь\_1| **SEQ ID NO: 46**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGAGGAQ
VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSN
KHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPSSFYFDYWGQGTL
VTVSSGTEGKSSGSGSESKSTDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNY
LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ

>BBBB1545|легкая\_цепь\_1/2| **SEQ ID NO: 24** DIVITQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTR ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVA

APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## >BBBB1545 тяжелая цепь 2 SEQ ID NO: 17

- 5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
- 10 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK BBBB1543

>BBBB1543|тяжелая\_цепь\_1| **SEQ ID NO: 4**7

- 15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
- 20 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGAGGAQ VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSN KHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPSHFYFDYWGQGTL
- 25 <u>VTVSSGTEGKSSGSESKSTDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNY</u> <u>LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ</u> QYYSTPPTFGQGTKVVIK

#### >BBBB1543|легкая цепь 1/2| **SEQ ID NO: 24**

- 30 DIVITQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTR ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- >BBBB1543|тяжелая\_цепь\_2| SEQ ID NO: 17
   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
   40 CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL

DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

#### 45 **BBBB1508**

50

>BBBB1508|тяжелая\_цепь\_1| **SEQ ID NO: 48**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP

CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGAGGAQ
VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSN
KHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPSSFYFDYWGQGTL
VTVSSGTEGKSSGSGSESKSTDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNY
LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ
QYYSTPPTFGQGTKVVIK

10

15

45

5

>BBBB1508|легкая\_цепь\_1/2| **SEQ ID NO: 21**DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWLQQRPGQPPRLLIYLMST
RASGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>BBBB1508|тяжелая\_цепь\_2| **SEQ ID NO: 22**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

#### **BBBB1506**

>BBBB1506|тяжелая цепь 1| **SEQ ID NO: 49** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAOKLOGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGOGTL 30 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTOTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG **OPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL** 35 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGAGGA*Q VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSN KHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPSHFYFDYWGQGTL VTVSSGTEGKSSGSGSESKSTDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNY 40 LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QYYSTPPTFGQGTKVVIK

>BBBB1506|легкая\_цепь\_1/2| **SEQ ID NO: 21**DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWLQQRPGQPPRLLIYLMST
RASGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>BBBB1506|тяжелая цепь 2| **SEQ ID NO: 22** 

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

#### 10 **BBBB1505**

5

30

40

45

>BBBB1505|тяжелая цепь 1| **SEQ ID NO: 48** 

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF

- 15 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGAGGAQ
- 20 VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSN KHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPSSFYFDYWGQGTL VTVSSGTEGKSSGSGSESKSTDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QYYSTPPTFGQGTKVVIK
- 25 >BBBB1505|легкая\_цепь\_1/2| **SEQ ID NO: 60**DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLMSTR
  ASGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVA
  APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
  KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>BBBB1505|тяжелая\_цепь\_2| **SEQ ID NO: 22**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
35 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

#### **BBBB1503**

>BBBB1503|тяжелая цепь 1| **SEQ ID NO: 49** 

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP

PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL

50 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGAGGA*Q

VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSN KHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPSHFYFDYWGQGTL VTVSSGTEGKSSGSGSESKSTDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QYYSTPPTFGQGTKVVIK

5 <u>QYYSTPPTFGQGTKVVIK</u>

10

30

40

>BBBB1503|легкая\_цепь\_1/2| **SEQ ID NO: 60**DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLMSTR
ASGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

>BBBB1503|тяжелая цепь 2| **SEQ ID NO: 22** 

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR
GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
OPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVL

>VH PT1B1183, SEQ ID NO: 18

DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS<u>GYTFTSYWIT</u>WVRQRPGQGLEWMG<u>DIHPG</u>
25 <u>RGSTK</u>YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR<u>RWGFDY</u>WGQG
TLVTVSS

>VL PT1B1183, SEQ ID NO: 59
DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLMST
RASGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIK

<u>>HCDR1 PT1B1183, SEQ ID NO: 4</u> GYTFTSYWIT

35 <u>>HCDR2 PT1B1183, SEQ ID NO: 5</u> DIHPGRGSTK

> >HCDR3 PT1B1183, SEQ ID NO: 6 RWGFDY

>LCDR1 PT1B1183, SEQ ID NO: 7 RSSKSLLYKDGKTYLN

2LCDR2 PT1B1183, SEQ ID NO: 8 LMSTRAS

> >LCDR3 PT1B1183, SEQ ID NO: 9 QQLVDYPLT

50 >HC1 PT1B1183, SEQ ID NO: 20

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## 10 >LC PT1B1183, SEQ ID NO: 60

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLMSTR ASGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15

5

## >HC2 PT1B1183, SEQ ID NO: 22

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

25

30

20

## >HC PT1B1183, SEQ ID NO: 62

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWITWVRQRPGQGLEWMGDIHPGR GSTKYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRWGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка, состоящем из аминокислотной последовательности или находящемся внутри аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают парные спиральные филаменты (PHF)-тау, предпочтительно PHF человеческого тау-белка, при этом эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435 тау-белка, но не содержит всех из фосфорилированного T427, фосфорилированного S435.
- 2. Выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7 или 14, 8 и 9 соответственно; причем выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 12 или 18, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 13, 19, 23 или 59.

3. Выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12 или 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, 19, 23 или 59.

- 4. Выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–3, содержащие:
  - (а) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13;

5

10

15

20

- (b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19;
- (c) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23; или
- (d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 59.
- 5. Выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–4, содержащие:
  - (a) первую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15 или 20;
  - (b) две легкие цепи, каждая из которых независимо имеет полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, 21, 24 или 60; и
  - (c) вторую тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17 или 22.
- 25 6. Выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–4, содержащие:
  - (a) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 61 или 62; и
  - (b) легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16, или 24, или 21, или 60 соответственно.
  - 7. Конъюгат, содержащий выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–6, связанные с антителом к CD98 или рецептору трансферрина (TfR) или его антигенсвязывающим фрагментом.

8. Конъюгат по п. 7, в котором антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с CD98, предпочтительно тяжелой цепью человеческого CD98 (CD98hc), или TfR, предпочтительно человеческим TfR1, соответственно с константой диссоциации  $K_D$  по меньшей мере 1 нM, предпочтительно 1–500 нM, при нейтральном pH, и константой скорости диссоциации  $k_d$  по меньшей мере  $10^{-4}$  с<sup>-1</sup>, предпочтительно от  $10^{-4}$  до  $10^{-1}$  с<sup>-1</sup> при кислотном pH, предпочтительно pH 5.

5

15

- 9. Конъюгат по п. 7 или 8, в котором антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент имеют константу скорости диссоциации  $k_d$  от 2 х  $10^{-2}$  до 2 х  $10^{-4}$  с<sup>-1</sup>, предпочтительно 8 х  $10^{-3}$  с<sup>-1</sup>, при нейтральном pH.
  - 10. Конъюгат по любому из пп. 7–9, в котором антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем:
    - (a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела к CD98 или его антигенсвязывающего фрагмента имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26, 27, 28 или 33, 29, 30 и 31 соответственно; или
    - (b) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела к TfR или его антигенсвязывающего фрагмента имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40 соответственно.
- 11. Конъюгат по любому из пп. 7–10, в котором антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи, ковалентно связанную с вариабельной областью легкой цепи посредством линкера, причем линкер предпочтительно имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 или 56,
  30 более предпочтительно scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, например на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% идентична последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 41.

12. Слитая конструкция, содержащая конъюгат по любому из пп. 7–11, в которой антитело к CD98 или TfR или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с карбокси-концом только одной из двух тяжелых цепей выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента посредством линкера, причем линкер предпочтительно имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

- 13. Слитая конструкция по п. 12, в которой каждая из двух тяжелых цепей выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит одну или более гетеродимерных мутаций, таких как модифицированный гетеродимерный домен СН3, или одну или более мутаций «выступ-во-впадину» по сравнению с полипептидом домена СН3 дикого типа.
- 14. Слитая конструкция по п. 13, в которой модифицированный гетеродимерный домен СНЗ первой тяжелой цепи содержит аминокислотные модификации в положениях Т350, L351, F405 и Y407, а модифицированный гетеродимерный домен СНЗ второй тяжелой цепи содержит аминокислотные модификации в положениях Т350, Т366, K392 и Т394, причем аминокислотная модификация в положении Т350 представляет собой Т350V, T350I, T350L или Т350М; аминокислотная модификация в положении L351 представляет собой L351Y; аминокислотная модификация в положении F405 представляет собой F405A, F405V, F405T или F405S; аминокислотная модификация в положении Y407 представляет собой Y407V, Y407A или Y407I; аминокислотная модификация в положении T366 представляет собой T366L, T366V или T366M, аминокислотная модификация в положении К392 представляет собой K392F, K392L или K392M, а аминокислотная модификация в положении Т394 представляет собой T394W, и при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу ЕС, как указано в номенклатуре Кабата.
  - 15. Слитая конструкция по п. 13, в которой модифицированный гетеродимерный домен СН3 первой тяжелой цепи содержит мутацию Т366W, а модифицированный гетеродимерный домен СН3 второй тяжелой цепи содержит мутации Т366S, L368A и Y407V.
- 16. Слитая конструкция по любому из пп. 12–15, в которой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или

более мутаций в домене Fc, которые усиливают связывание слияния с неонатальным рецептором Fc (RcRn), причем предпочтительно одна или более мутаций усиливают связывание при кислотном pH, более предпочтительно Fc имеет мутации M252Y/S254T/T256E (YTE), при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу EC, как указано в номенклатуре Кабата.

17. Слитая конструкция по любому из пп. 12–16, в которой выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более мутаций в домене Fc, которые уменьшают или устраняют эффекторную функцию, причем предпочтительно Fc имеет одну или более аминокислотных модификаций в положениях L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329, например одну, две или три мутации L234A, L235A и P331S, при этом нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу EC, как указано в номенклатуре Кабата.

15 18. Слитая конструкция, содержащая:

5

10

20

- (a) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42–49;
- (b) две легкие цепи, каждая из которых независимо имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 21, 24 и 60; и
- (c) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17 и 22.
- 25 19. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–6, конъюгат по любому из пп. 7–11 или слитую конструкцию по любому из пп. 12–18.
  - 20. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 19.
  - 21. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 19 или вектор по п. 20.
- 22. Способ получения гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–6, конъюгата по любому из пп. 7–11 или слитой

конструкции по любому из пп. 12–18, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат или слитую конструкцию в условиях для получения гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции и выделение гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата или слитой конструкции из клетки или клеточной культуры.

5

15

- 23. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–6, конъюгат по любому из пп. 7–11 или слитую конструкцию по любому из пп. 12–18 и фармацевтически приемлемый носитель.
  - 24. Способ блокирования агрегирования тау у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 23.
    - 25. Способ индуцирования антителозависимого фагоцитоза (ADP) без стимуляции секреции провоспалительного цитокина у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 23.
  - 26. Способ лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 23.
- 27. Способ снижения патологической агрегации тау-белка или распространения
   25 таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту
   фармацевтической композиции по п. 23.
- 28. Способ по п. 27, в котором таупатия выбрана из группы, состоящей из наследственной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно30 височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна Штреусслера Шейнкера, болезни Галлервордена Шпатца, миозита с тельцами

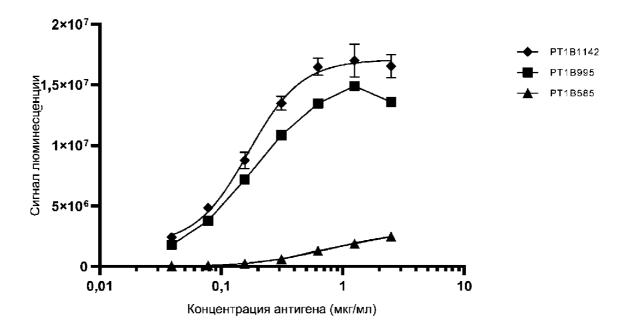
включения, болезни Крейцфельда — Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна — Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugulistica (деменции боксеров).

- 29. Способ по любому из пп. 23–27, в котором фармацевтическую композицию вводят внутривенно.
- 30. Способ по любому из пп. 24–29, в котором фармацевтическую композицию доставляют через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) субъекта.

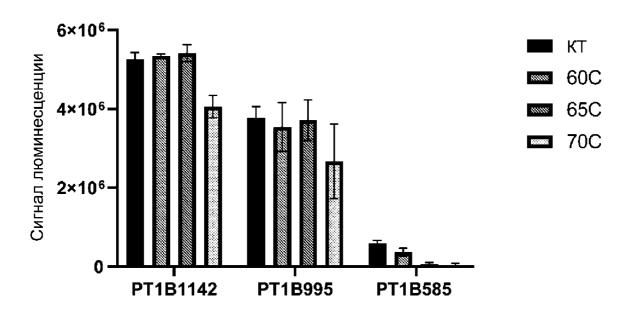
5

10

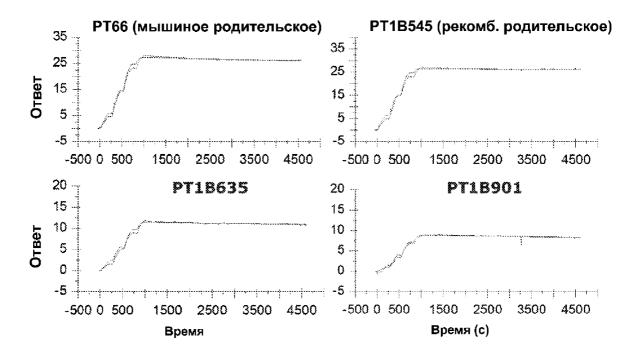
- 31. Способ по любому из пп. 24–30, в котором введение уменьшает Fcопосредованную эффекторную функцию и/или не вызывает быстрого истощения ретикулоцитов.
  - 32. Способ обнаружения наличия PHF-тау во взятой у субъекта биологической пробе, включающий приведение биологической пробы в контакт с выделенным гуманизированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1–6 и обнаружение связывания гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с PHF-тау во взятой у субъекта пробе.
- 33. Способ по п. 32, в котором биологическая проба представляет собой пробу25 крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости.



ФИГ. 1

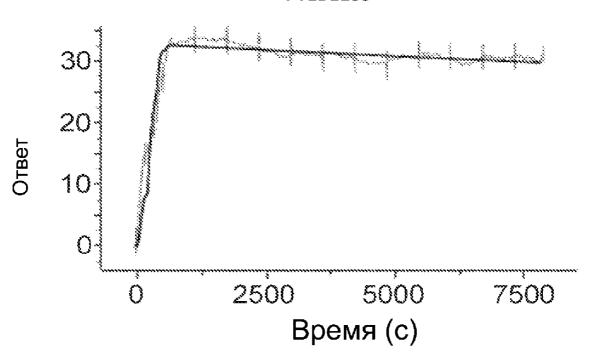


ФИГ. 2



ФИГ. 3





ФИГ. 4