



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.23

(21) Номер заявки
201692394

(22) Дата подачи заявки
2015.06.26

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

**(54) АНТИТЕЛА И АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ, КОТОРЫЕ
СПЕЦИФИЧНО СВЯЗЫВАЮТСЯ С БЕЛКОМ ТАУ, АССОЦИИРОВАННЫМ С
МИКРОТРУБОЧКАМИ**

(31) 62/017,812; 62/017,789; 62/017,807;
62/017,746; 14179699.5; 14179706.8;
14179719.1; 14179739.9

(32) 2014.06.26; 2014.06.26; 2014.06.26;
2014.06.26; 2014.08.04; 2014.08.04;
2014.08.04; 2014.08.04

(33) US; US; US; US; EP; EP; EP; EP

(43) 2017.04.28

(86) PCT/EP2015/064529

(87) WO 2015/197820 2015.12.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН ВЭКЦИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:
**Вадиа Джехангир, Паскуал Габриель
(US), Уилльямсон Роберт Энтони,
Радосевич Катарина, Гоудсмит Яап
(NL)**

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

(56) WO-A1-9505466
L.I. BINDER ET AL.: "The distribution of tau in
the mammalian central nervous system", THE JOURNAL
OF CELL BIOLOGY, vol. 101, no. 4, 1 October
1985 (1985-10-01), pages 1371-1378, XP055161258,
ISSN: 0021-9525, DOI: 10.1083/jcb.101.4.1371, the whole
document in particular, abstract, figures 1-6

WO-A2-2010144711
WO-A1-2013041962
N. GHOSHAL: "Tau Conformational Changes
Correspond to Impairments of Episodic Memory in
Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease",
EXPERIMENTAL NEUROLOGY, vol. 177, no. 2, 1
October 2002 (2002-10-01), pages 475-493, XP055089574,
ISSN: 0014-4886, DOI: 10.1006/exnr.2002.8014, abstract,
table 1

P.M. HOROWITZ: "Early N-Terminal Changes
and Caspase-6 Cleavage of Tau in Alzheimer's
Disease", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol.
24, no. 36, 8 September 2004 (2004-09-08),
pages 7895-7902, XP055132970, ISSN: 0270-6474,
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1988-04.2004, abstract, pages
7895-7896, 7900, table 1

AARON L. NELSON ET AL.: "Development trends
for human monoclonal antibody therapeutics", NATURE
REVIEWS DRUG DISCOVERY, vol. 9, 1 October
2010 (2010-10-01), pages 767-774, XP055161533, DOI:
10.1038/nrd3229, abstract, box 1, figure 2, table 1

WEINER LOUIS M.: "Fully human
therapeutic monoclonal antibodies", JOURNAL OF
IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS &
WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 29,
no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages
1-9, XP009118693, ISSN: 1524-9557, DOI:
10.1097/01.CJI.0000192105.24583.83, abstract, figures 1-2

DIJK VAN MARC A. ET AL.: "Human antibodies
as next generation therapeutics", CURRENT OPINION
IN CHEMICAL BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD,
LONDON, GB, vol. 5, no. 4, 1 August 2001 (2001-08-01),
pages 368-374, XP002412136, ISSN: 1367-5931, DOI:
10.1016/S1367-5931(00)00216-7, the whole document, in
particular, abstract, figures 1-3, table 2

WO-A2-2014100600

(57) Изобретение относится к антителу и антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с тау-белком в нормальной ткани головного мозга человека и не связываются с тау-белком в ткани головного мозга человека с AD. Кроме того, изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей указанное антитело и фрагмент, к вектору экспрессии, к клетке-хозяину, к способу получения антитела или фрагмента, к фармацевтической композиции для лечения нейродегенеративных тауопатий, которая содержит это антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Область изобретения

Изобретение относится к медицине. Изобретение, в частности, относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с белком тау, ассоциированным с микротрубочками. Изобретение также относится к диагностическим, профилактическим и терапевтическим способам, в которых применяются антитела к тау-белку.

Предпосылки изобретения

Деменция является синдромом, который может быть вызван целым рядом прогрессирующих расстройств, влияющих на память, мышление, поведение и способность выполнять повседневные действия. В настоящее время приблизительно 36 миллионов человек во всем мире страдают от деменции. По прогнозам количество людей с деменцией увеличится в два раза к 2030 году и больше чем в три раза до 115,4 миллиона человек к 2050 году. Болезнь Альцгеймера является наиболее распространенным типом деменции. На данный момент у одного из девяти человек в возрасте 65 лет и старше (11%) и почти у половины тех, кто старше 85 лет, имеется болезнь Альцгеймера. Согласно Международной ассоциации болезни Альцгеймера текущие глобальные расходы на уход за этими пациентами превышают \$600 миллиардов в год. Эти расходы вероятно возрастут даже быстрее, чем распространенность заболевания, особенно в развивающихся странах, так как возникает больше установленных законом систем социальной защиты, и рост доходов приводит к повышению альтернативных издержек (Winblad B. and Jonsson L., World Alzheimer Report 2010).

В головном мозге пациентов с AD в больших количествах присутствуют две аномальные структуры: амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубки. Особенно это касается определенных областей головного мозга, которые играют важную роль в отношении памяти. Также наблюдается значительная потеря нейронов и синапсов в коре головного мозга и в определенных подкорковых областях. Как количество нейрофибриллярных клубков, так и потеря нейронов возрастают параллельно с продолжительностью и тяжестью заболевания (Gomez-Isla T. et al., Ann. Neurol., 1997; 41:17-24) и было показано, что нейрофибриллярная нагрузка коррелирует с когнитивными нарушениями. (Braak H. and Braak E., Neurobiol. Aging, 1997 Jul-Aug;18(4):351-7).

Нейрофибриллярные клубки являются внутринеурональными очагами, которые состоят из гиперфосфорилированных и нерастворимых скоплений тау-белка, ассоциированного с микротрубочками. Эти скопления являются гистопатологическим отличительным признаком многих нейродегенеративных заболеваний, которые известны под общим названием таупатий. Таупатии включают, например, болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Пика (PiD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD) и лобно-височную лобарную дегенерацию (FTLD). При таупатиях у человека патология прогрессирует, распространяясь от одной области головного мозга к другой характерным для конкретного заболевания образом (Braak H. and Braak E., Neurobiol. Aging, 1997 Jul-Aug; 18(4):351-7, Raj et al., Neuron, 2012; 73:1204-1215, Seeley et al., Neuron, 2009; 62: 42-52. и Zhou et al., Neuron, 2012; 73:1216-1227), причем основной механизм этого пока не ясен.

Патологический тау-белок связан со многими таупатиями и может быть их причиной. В нормальной форме тау-белок является хорошо растворимым белком, ассоциированным с микротрубочками (Jeganathan et al., Biochemistry 2008; 47:10526-10539), который связывается с микротрубочками и способствует их сборке (Drechsel et al., Mol. Biol. Cell, 1992; 3:1141-1154.). Однако при таупатиях тау-белок становится гиперфосфорилированным, что приводит к его отсоединению от микротрубочек и, в конечном итоге, к скоплению в виде нейрофибриллярных клубков, которые визуализируются в пределах дистрофического нейрита и клеточных телец (Mandelkow and Mandelkow, Cold Spring Harbor Perspect Med 2, 2012; a006247). Количество патологического тау-белка коррелирует с прогрессирующей нейрональной дисфункцией, потерей синапсов и функциональными нарушениями у человека и в моделях на трансгенных мышах (Arriagada et al., Neurology, 1992 Mar; 42(3 Pt 1):631-9, Baner et al., Neurosci. Lett., 1993; 162:179-182, Polydoro et al., J. Neurosci., 2009; 29:10741-10749 и Small and Duff, Neuron., 2008 Nov 26;60(4):534-42). Притом что при болезни Альцгеймера мутации тау-белка не наблюдаются, мутации в гене тау-белка, по всей видимости, приводят к некоторым формам лобно-височной деменции (Cairns et al., Am. J. Pathol., 2007; 171: 227-40), при которых проявляются тау-положительные включения, и это означает, что дисфункции тау-белка достаточно для того, чтобы вызвать нейродегенерацию. Более того, патологический тау-белок, по-видимому, является неотъемлемой частью A β -индуцированной нейротоксичности в культуре клеток и моделях на трансгенных животных (Rapoport M., PNAS, 2002; 99:9, 6364-6369., Roberson E.D. et al., Science, 2007; 316:750-754, Nicholson A.M. and Ferreira A., J. Neurosci., 2009; 29:4640-4651, Oakley H., J. Neurosci., 2006;26 (40):10129-10140).

Пассивную и активную иммунизацию против тау-белка анализировали на мышах с использованием нескольких разных мышинных моделей, включая разные фосфо-тау-пептиды для активной иммунизации и антитела к тау-белку для пассивной иммунотерапии (Asuni A.A. et al., J. Neurosci., 2007;27(34):9115-9129., Sigurdsson E.M. Curr Alzheimer Res. 2009;6(5):446-450., Boutajangout A. et al., J. Neurosci. 2010;30 (49):16559-16566., Rosenmann H, et al. Arch Neurol. 2006;63(10):1459-1467., Boimel M, et al., Exp. Neurol., 2010; 224(2): 472-485). В первом сообщении, описывающем иммунизацию с использованием фосфорилированного тау-пептида длиной 30 аминокислот, были показаны влияние на соотношения растворимого и

нерастворимого тау-белка, уменьшение образования клубка у иммунизированных мышей и функциональные положительные эффекты, наблюдаемые в поведенческом тесте у этих мышей (Boutajangout A. et al, J. Neuroscience, 2010; 30:16559-16566). Пассивная иммунизация с использованием хорошо изученных антител к тау-белку, которые вступают в реакцию с фосфорилированным Ser396 и Ser404 гиперфосфорилированного тау-белка на раннем патологическом конформационном эпитопе тау-белка, подтвердила результаты, полученные в исследованиях с активной иммунизацией. На мышах, обработанных этими антителами, было показано значительное снижение количества патологического тау-белка, которое измеряли посредством биохимических способов и гистологических методик, а также значительная отсрочка развития нарушения, связанного с потерей двигательной функции, которую оценивали в поведенческих тестах. (Boutajangout A. et al. J. Neurochem., 2011;118(4):658-667, Chai X. et al. J. Biol. Chem., 2011;286(39):34457-34467.)

На сегодняшний день способы терапии, направленные на тау-белок, анализируют только на мышиных моделях. Но принимая во внимание тяжесть таупатий в целом и затраты общества, связанные с болезнью Альцгеймера, в частности, все еще существует потребность в эффективных средствах диагностики, мониторинга, предупреждения и лечения таупатий.

Краткое описание изобретения

Изобретение предусматривает антитела, содержащие антигенсвязывающую вариабельную область, которая специфично связывается с тау-белком. Настоящее изобретение, в частности, предусматривает антитела к тау-белку и их антигенсвязывающие фрагменты, которые обнаруживают тау-белок в нормальной (т.е. здоровой) ткани головного мозга человека, но не обнаруживают отложения тау-белка в ткани головного мозга человека с болезнью Альцгеймера (AD). Антитела к тау-белку и их антигенсвязывающие фрагменты связываются с рекомбинантным тау-белком и PHF-тау-белком в ходе вестерн-блот-анализа и не связываются с PHF-тау-белком в ходе ELISA. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты способны специфично связываться с нефосфорилированным тау-пептидом. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты способны связываться с дефосфорилированной тканью головного мозга с AD.

В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты способны связываться с дефосфорилированной тканью головного мозга с AD и дефосфорилированным PHF-тау-белком. В некоторых других вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению являются нефосфоселективными и не связываются с пептидом, фосфорилированным по серину 316. В некоторых других вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению являются нефосфоселективными и не связываются с пептидом, фосфорилированным по серину 61 и/или треонину 63.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает химерные антитела, содержащие антигенсвязывающую вариабельную область из встречающегося в природе человеческого антитела, которая специфично связывается с тау-белком, и рекомбинантную константную область из IgG1 человека, где константная область химерного антитела является отличной от встречающегося в природе антитела.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела к тау-белку и их антигенсвязывающие фрагменты, которые обнаруживают тау-белок в нормальной ткани головного мозга человека, но не обнаруживают отложения тау-белка в ткани головного мозга человека с болезнью Альцгеймера (AD) и с прогрессирующим надъядерным параличом (PSP).

В некоторых вариантах осуществления химерные антитела к тау-белку и их антигенсвязывающие фрагменты связываются с рекомбинантным тау-белком или PHF-тау-белком в ходе вестерн-блот-анализа. В других вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты предпочтительно способны специфично связываться с нефосфорилированным тау-пептидом.

Предпочтительно, антитела являются антителами человека.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению являются применимыми в качестве диагностических, профилактических и/или терапевтических средств как отдельно, так и в комбинации с другими диагностическими, профилактическими и/или терапевтическими средствами.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу к тау-белку, содержащему антигенсвязывающий участок, содержащий CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 201, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 202 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 203, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 204, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 205 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 206 и к его антигенсвязывающим фрагментам. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к антителу к тау-белку, содержащему CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 207, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 208 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 209, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 210, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 211 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212 и к его антигенсвязывающим фрагментам. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к антителу к тау-белку, содержащему антигенсвязывающий участок, содержащий CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 222, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 223 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 224, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 225, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 226 и к его антигенсвязывающим фрагментам. Другой вариант осуществления настоящего изобрете-

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенному химерному антителу к тау-белку, содержащему антигенсвязывающий участок вариабельной области тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 115, или 119, или 135, или 147, или 151, или 155, или 159, и антигенсвязывающий участок вариабельной области легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 116, или 120, или 136, или 148, или 152, или 156, или 160. Согласно другому аспекту настоящего изобретения антитело является не встречающимся в природе.

В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи IgG1 состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 83. В другом варианте осуществления константная область легкой

цепи IgG1 состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 84.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Другой аспект настоящего изобретения представлен вектором, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Дополнительным объектом изобретения является клетка-хозяин, содержащая вектор по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также предусматривает способ получения антитела к тау-белку, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению и выделение антитела, полученного с помощью клетки-хозяина.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает функциональные варианты антител и иммуноконъюгаты, содержащие антитело и/или его антигенсвязывающий фрагмент.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает композиции и наборы, которые содержат одно или несколько антител по настоящему изобретению и/или их антигенсвязывающие фрагменты. Настоящее изобретение дополнительно предусматривает диагностические, профилактические и терапевтические способы, в которых используют антитела к тау-белку. Профилактические и терапевтические способы включают введение людям-субъектам антител к тау-белку и/или их антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения или лечения таупатии и/или заболеваний или состояний, опосредованных тау-белком, и/или уменьшения тяжести одного или нескольких симптомов таупатии или заболевания, опосредованного тау-белком. Для комбинированной терапии можно применять комбинации множества разных антител к тау-белку и/или их антигенсвязывающих фрагментов с другими антителами к тау-белку. Также предусмотрены композиции, содержащие антитела к тау-белку и/или их антигенсвязывающие фрагменты в комбинации с другими профилактическими или терапевтическими средствами.

Антитела по настоящему изобретению уникальны тем, что вариабельные области выделены из В-клеток памяти, специфичных в отношении тау-белка, от здоровых индивидуумов и обнаруживают тау-белок в нормальном головном мозге человека, но не обнаруживают отложения тау-белка в головном мозге человека с болезнью Альцгеймера. Антитела к тау-белку также уникальны тем, что они связываются с денатурированным PHF-тау-белком в вестерн-блот-анализе, но не связываются с неденатурированным PHF-тау-белком в ELISA. Антитела к тау-белку связываются с немодифицированным тау-пептидом 299-369 (SEQ ID NO: 331) или тау-пептидом 42-103 (SEQ ID NO: 325). Химерные антитела дополнительно связываются с немодифицированным тау-пептидом, тау-пептидом 52-71 (SEQ ID NO: 382), или тау-пептидом 299-323 (SEQ ID NO: 458), или тау-пептидом 82-103 (SEQ ID NO: 386). Антитела по настоящему изобретению уникальны тем, что они связываются с дефосфорилированным головным мозгом с AD и не связываются с тау-пептидом, фосфорилированным по серину 316, или серину 61, или треонину 63 тау-белка.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1a-t показана реактивность CBTAU-7.1, 8.1, 16.1, 18.1, 20.1, 22.1, 24.1, 27.1, 28.1, 41.1, 41.2, 42.1, 43.1, 44.1, 45.1, 46.1, 47.1, 47.2 и 49.1 в отношении соответствующего родственного и неродственного пептида;

на фиг. 2a-j - реактивность CBTAU-7.1, 8.1, 16.1, 18.1, 20.1, 22.1, 24.1, 27.1 и 28.1 в отношении рекомбинантного тау-белка (rTau), обогащенных очищенных иммуноаффинным способом спаренных спиральных филаментов (ePHF) и очищенных иммуноаффинным способом спаренных спиральных филаментов (iPHF) в ходе ELISA. В качестве положительного контроля использовали mAb к тау-белку - AT8;

на фиг. 3 - иммунореактивность CBTAU-7.1, 18.1, 22.1, 24.1, 27.1 и 28.1 в отношении rtau, ePHF и iPHF в ходе вестерн-блот-анализа;

на фиг. 4a-g - эпитопное картирование CBTAU-27.1, 28.1, 43.1, 46.1, 47.1, 47.2 и 49.1 с использованием перекрывающихся пептидов, которые соответствуют областям 42-103 и 299-369 tau441 человека;

на фиг. 5a-d - результаты иммуногистохимического исследования для mAb CBTAU, подробно описанных в данной заявке. На фиг. 5a-b показано иммуноокрашивание с использованием CBTAU-7.1, 8.1, 16.1, 18.1, 20.1, 22.1, 24.1, 27.1 и 28.1 срезов ткани гиппокампа и кортикальной ткани без AD в сравнении с тканью с AD соответственно. На фиг. 5c показано иммуноокрашивание с использованием CBTAU-7.1, 8.1, 16.1, 18.1, 20.1, 22.1 и 24.1 срезов кортикальной ткани без PSP и с PSP. На фиг. 5d показано иммуноокрашивание с использованием CBTAU-43.1, 46.1, 47.2 и 49.1 в отношении срезов кортикальной ткани без AD и с AD;

на фиг. 6a - иммунореактивность CBTAU-28.1 и контрольных mAb в отношении срезов ткани гиппокампа без AD (мужчина в возрасте 54 лет; без клинических симптомов) и с AD (женщина латиноамериканского происхождения в возрасте 93 лет);

на фиг. 6b - реактивность CBTAU-28.1 и контрольных mAb в отношении срезов ткани гиппокампа с AD (женщина латиноамериканского происхождения в возрасте 93 лет) в случае обработки фосфатазой из кишечника теленка и без обработки;

на фиг. 7 - реактивность CBTAU-28.1 и mAb к фосфо-тау-белку, AT8, в отношении iPHF (очищенных иммуноаффинным способом спаренных спиральных филаментов) и образцов iPHF, обработанных фосфатазой из кишечника теленка;

на фиг. 8a-e - реактивность CBTAU-27.1, 28.1, 43.1, 46.1, 47.1, 47.2 и 49.1 в отношении тау-

фосфопептидов, подробно описанных в табл. 30-34.

Подробное описание изобретения

Определения.

Ниже даны определения терминов, используемых в настоящем изобретении.

Полагают, что термин "включенный" или "включая", используемый в данном документе, должен сопровождаться словами "без ограничения".

Используемый в данном документе термин "тау-белок" используют взаимозаменяемо с конкретным указанием нативной мономерной формы тау-белка. Термин "тау-белок" также используют для того, чтобы в целом обозначить другие конформеры тау-белка, например олигомеры или агрегаты тау-белка. Термин "тау-белок" также используют для обозначения совокупности всех типов и форм тау-белка. По причине альтернативного сплайсинга в головном мозге человека присутствует 6 изоформ тау-белка. Эти изоформы различаются отсутствием или наличием одной или двух вставок 29 аминокислот, кодируемых экзоном 2 и 3, в аминоконцевой части, в комбинации с тремя (R1, R3 и R4) или четырьмя (R1-R4) областями повторов в карбоксиконцевой части. Домен, связывающий микротрубочки, кодируется экзоном 10. Изоформы тау-белка у взрослого человека включают самый длинный компонент из 441 аминокислоты (SEQ ID NO: 1), или 4R/2N, компонент из 410 аминокислот (SEQ ID NO: 2), или 3R/2N, компонент из 412 аминокислот (SEQ ID NO: 3), или 4R/1N, компонент из 381 аминокислоты (SEQ ID NO: 4), или 3R/1N, и компонент из 383 аминокислот (SEQ ID NO: 5), или 4R/0N. Самая короткая изоформа из 352 аминокислот (SEQ ID NO: 6), или 3R/0N, обнаружена в головном мозге плода и, таким образом, ее называют эмбриональной изоформой тау-белка.

Аминокислотную последовательность тау-белка "дикого типа", представленную изоформой из 441 аминокислоты (SEQ ID NO: 1), также называют "tau441", "4R/2N", "hTau40", "TauF", "Tau-4" или "полно-размерный тау-белок".

Термин "рекомбинантный тау-белок" в данном документе относится к самой длинной изоформе тау-белка в головном мозге человека (SEQ ID NO: 1), экспрессированной в *E.coli* и очищенной до гомогенности или почти до гомогенности (Barghorn S., Meth. Mol. Biol., 2004, 299:35-51). Рекомбинантный тау-белок является растворимым и нефосфорилированным.

Термин "нейрофибрилярный клубок" (NFT) относится к патологическим структурам, впервые описанным Альцгеймером в головном мозге пациента с деменцией. NFT состоит из упорядоченно расположенных субъединиц, которые называются спаренными спиральными филаментами, агрегатами гиперфосфорилированного белка тау, которые наиболее широко известны как основной маркер болезни Альцгеймера.

Используемый в данном документе термин "спаренный спиральный филамент тау-белка" или "PHF-тау-белок" относится к широко известным агрегатам тау-белка, которые составляют патологические структуры, называемые нейрофибрилярными клубками (NFT), впервые описанные Альцгеймером в головном мозге пациента с деменцией. Они также присутствуют при многих других заболеваниях, известных как таупатии.

"Обогащенный PHF-тау-белок" или "ePHF тау-белок" получают в соответствии с протоколом Greenberg и Davies, как описано в примерах. PHF-тау-белок обогащают при $27200 \times g$ из супернатантов, содержащих 0,8M NaCl, за счет использования его нерастворимости в цвиттерионных детергентах (Kosik K.S. et al. (1986) PNAS USA 83, 4044-4048, Rubenstein R. et al. (1986) Brain Res. 372, 80-88) и меркапто-этаноле. В PHF, выделенных с использованием цвиттерионных детергентов, по всей видимости, сохраняются антигенные детерминанты, которые могут быть утрачены в ходе выделения нейрофибрилярных клубков, нерастворимых в SDS, и при этом они схожи по структуре и имеют многие антигенные свойства при сравнении с PHF в NFT. "Очищенный иммуноаффинным способом PHF-тау-белок" или "iPHF тау-белок" является аффинно очищенным с помощью моноклонального антитела к тау-белку. Такие протоколы предусматривают препараты PHF-тау-белка, в которых сохраняется классическая структура спаренного спирального филамента, определенная с помощью электронной микроскопии, и при этом они являются полностью растворимыми при низких концентрациях SDS (Jicha G., 1997, 48(2):128-32). PHF-тау-белок также образуется из рекомбинантного тау-белка посредством индукции полимеризации *in-vitro* с использованием гепарина (Mandelkow et al. Methods in Molecular Biology 299:35-51(2004)). В качестве альтернативы, PHF-тау-белок выделяют с помощью многих других способов из головного мозга пациентов с AD с использованием протоколов, таких как описанные Rostagna и Ghiso (Rostagna A. and Ghiso J., Curr. Protoc. Cell Biol. Sep 2009; CHAPTER: Unit-3.3333.). Определяют характеристики выделенного PHF-тау-белка по его чистоте и состоянию гиперфосфорилирования с использованием антител, которые, как известно, вступают в реакцию с PHF-тау-белком. В стандартном препарате PHF-тау-белка гиперфосфорилированные полосы, мигрирующие при приблизительно 60, 64, 68 и 72 кДа в ходе вестерн-блоттинга (Spillantini and Goedert Trends Neurosci, 21:428-33, 1998), обнаруживают посредством антитела AT8, которое специфично связывается с гиперфосфорилированным PHF-тау-белком и не связывается с дефосфорилированным PHF-тау-белком.

Используемый в данном документе термин "антитела" следует понимать в широком смысле, и он охватывает молекулы иммуноглобулина или антитела, включая поликлональные антитела, моноклональ-

ные антитела, в том числе мышинные, человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, биспецифичные или мультиспецифичные антитела и фрагменты антител. Как правило, антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые проявляют специфичность связывания с определенным антигеном. Структуры антител являются широко известными. Иммуноглобулины можно отнести 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 подразделены на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антитела любого вида позвоночных животных можно отнести к одному из двух четко различающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ), исходя из аминокислотных последовательностей их константных доменов.

Термин "антигенсвязывающие фрагменты" означает часть интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты, CDR, антигенсвязывающий участок, вариабельную область тяжелой или легкой цепи, диатела, триотела, молекулы одноцепочечных антител (scFv) и мультиспецифичные антитела, образованные по меньшей мере из двух интактных антител или их фрагментов, или (поли)пептиды, содержащие, по меньшей мере, фрагмент иммуноглобулина, которого достаточно для придания (поли)пептиду способности связывать антиген и т.д. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать пептид или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере из 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 или 250 смежных аминокислотных остатков из аминокислотной последовательности антитела. Антигенсвязывающие фрагменты можно получить путем синтеза или посредством ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов, или их можно получить генноинженерным путем с использованием методик рекомбинантной ДНК. Способы получения хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в *Antibodies: A Laboratory Manual*, Edited by: E. Harlow and D. Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, которое включено в данный документ посредством ссылки. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь один или несколько участков связывания. При наличии более одного участка связывания участки связывания могут быть идентичны друг другу или они могут отличаться.

Вариабельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из "каркасной" области, которая прерывается "антигенсвязывающими участками". Антигенсвязывающие участки определены с использованием множества терминов, приведенных ниже. (i) Определяющие комплементарность участки (CDR) основаны на вариабельности последовательности (Wu and Kabat J. Exp. Med., 132:211-50, 1970). Как правило, антигенсвязывающий участок имеет три CDR в каждой вариабельной области (HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в вариабельной области тяжелой цепи (VH) и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в вариабельной области легкой цепи (VL)) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) Термин "гипервариабельная область", "HVR" или "HV" относится к областям вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по структуре, как определено Chothia и Lesk (Chothia and Lesk J. Mol. Biol., 96:901-17, 1987). Как правило, антигенсвязывающий участок имеет три гипервариабельные области в каждой VH (H1, H2, H3) и VL (L1, L2, L3). Chothia и Lesk относят структурно консервативные HV к "каноническим структурам". Системы нумерации, а также аннотации CDR и HV недавно были пересмотрены Abhinandan и Martin (Abhinandan and Martin Mol. Immunol., 45:3832-9, 2008). (iii) Другое определение областей, которые образуют антигенсвязывающий участок, предложил Lefranc (Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 27:55-77, 2003), исходя из сравнения V-доменов из иммуноглобулинов и T-клеточных рецепторов. Международная база данных по иммуногенетике (The International ImMunoGeneTics database) (IMGT) (<http://www.imgt.org>) предусматривает стандартизованную нумерацию и определение этих областей. Соответствие между CDR, HV и картированием согласно IMGT описано Lefranc et al. Антигенсвязывающий участок можно также картировать исходя из частоты использования остатков, определяющих специфичность (SDRU) (Almagro J. Mol. Recognit., 17:132-43, 2004), где остатки, определяющие специфичность (SDR), относятся к аминокислотным остаткам иммуноглобулина, которые непосредственно участвуют в контакте с антигеном.

Kabat et al. также определили систему нумерации для последовательностей вариабельного домена, которая является применимой к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно применить эту систему "нумерации по Kabat" по отношению к любой последовательности вариабельного домена, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности. Используемая в данном документе "нумерация по Kabat" относится к системе нумерации, изложенной в Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Если конкретно не указано иное, упоминание нумерации определенных положений остатков аминокислот в антителе или антигенсвязывающем фрагменте, варианте или их производном по изобретению соответствует системе нумерации по Kabat, которая, однако, является теоретической и в то же время может не применяться к каждому антителу по настоящему изобретению. Например, в зависимости от положения первого CDR следующие CDR могут быть сдвинуты в любом направлении.

"Каркас" или "каркасная последовательность" являются остальными последовательностями в пределах вариабельной области антитела помимо тех, которые определены как последовательности антиген-

связывающего участка. Поскольку точное определение антигенсвязывающего участка можно получить при помощи множества методик картирования, как описано выше, точная каркасная последовательность зависит от определения антигенсвязывающего участка.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" (mAb) означает антитело (или фрагмент антитела), полученное из популяции практически однородных антител. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, при этом они обычно направлены против одной антигенной детерминанты.

Согласно одному аспекту антитело по настоящему изобретению является химерным человеческим антителом. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением термины "химерное человеческое антитело", или "рекомбинантное человеческое антитело" и т.п. используют для обозначения связывающей молекулы с антигенсвязывающими свойствами, которая происходит из человеческой клетки, т.е. антигенсвязывающий участок которой происходит из нуклеиновых кислот, полученных из человеческой клетки, такой как В-клетка, или частичную cDNA которой клонировали из mRNA человеческой клетки, например человеческой В-клетки памяти. Химерное антитело все еще является "человеческим", даже если в антителе были произведены аминокислотные замены, например, для улучшения биофизических или фармакокинетических характеристик. По сравнению с искусственно образованными антителами, подобными человеческим антителам, такими как фрагменты одноцепочечного антитела (scFv), полученные из фагового дисплея библиотеки антител или от мыши, экспрессирующей ксеногенные последовательности, химерное человеческое антитело по настоящему изобретению характеризуется (i) антигенсвязывающей областью, полученной с использованием иммунного ответа человека вместо имитации с использованием животных, т.е. антигенсвязывающая область была образована в ответ на природный тау-белок с его соответствующей конформацией в организме человека, и/или (ii) защитой индивидуума, или оно, по меньшей мере, является значимым для выявления присутствия тау-белка.

Антитела, которые происходят из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека и не экспрессирующих эндогенные иммуноглобулины, как описано ниже и, например, в патенте США № 5939598, выданном Kucherlapati et al., обозначают антитела, подобные человеческим антителам, с тем чтобы отличить их от антител, полученных от человека, по настоящему изобретению.

Например, спаривание тяжелой и легкой цепей антител, подобных человеческим антителам, таких как синтетические и частично синтетические антитела, обычно выделенные из фагового дисплея, необязательно отражает встречающееся в природе спаривание, которое происходит во встречающейся в природе В-клетке человека. Соответственно, Fab- и scFv-фрагменты, полученные из библиотек с рекомбинантной экспрессией, использование которых является общеизвестным из предшествующего уровня техники, можно рассматривать как искусственные со всеми возможными ассоциированными с этим эффектами в отношении иммуногенности и стабильности. В отличие от этого настоящее изобретение предусматривает антигенсвязывающие области антител с созревшей аффинностью к тау-белку от выбранных субъектов-людей, причем в некоторых вариантах осуществления они рекомбинантно экспрессируются как химеры с константной областью из обычного IgG1.

Используемый в данном документе термин "функциональный вариант" относится к антителу, которое содержит нуклеотидную и/или аминокислотную последовательность, которая изменена на один или несколько нуклеотидов и/или аминокислот в сравнении с нуклеотидными и/или аминокислотными последовательностями эталонного антитела, и которое способно конкурировать за специфичное связывание с партнером по связыванию, т.е. тау-белком, с эталонным антителом. Другими словами, модификации аминокислотной и/или нуклеотидной последовательности эталонного антитела существенно не влияют или не изменяют характеристики связывания антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью или содержащего аминокислотную последовательность, т.е. антитело все еще способно специфично распознавать и связывать свою мишень. Функциональный вариант может иметь модификации в консервативной последовательности, в том числе нуклеотидные и аминокислотные замены, присоединения и делеции. Примеры функциональных вариантов включают снижение риска наличия свободного цистеина или аминокислоты с потенциальной посттрансляционной модификацией в гипервариабельной области, а также конструирование Fc для увеличения/снижения аффинности связывания антитела IgG с FcRn, увеличения/снижения периода полужизни в сыворотке.

Функциональный вариант также может быть образован из антитела в виде химерного изотипа человеческого IgG2, IgG3 или IgG4 или в виде химерного изотипа, полученного от другого вида. Функциональный вариант также может представлять собой мутацию или мутации константных областей для увеличения образования биспецифичных антител. Эти модификации можно вводить с помощью стандартных методик, известных из уровня техники, таких как ПЦР, сайт-направленный мутагенез и ненаправленный опосредованный ПЦР мутагенез, и они могут включать природные, а также неприродные нуклеотиды и аминокислоты.

Используемый в данном документе термин "специфичное связывание" или "специфичное распознавание", который относится к взаимодействию антитела с его партнером по связыванию, например с антигеном, означает, что взаимодействие зависит от присутствия определенной аминокислотной последова-

тельности или структуры, например антигенной детерминанты или эпитопа, у партнера по связыванию. Другими словами, антитело предпочтительно связывается с партнером по связыванию или распознает его, даже если партнер по связыванию присутствует в смеси с другими молекулами или организмами. Связывание может быть опосредовано ковалентными или нековалентными взаимодействиями или их комбинацией. Другими словами, термин "специфичное связывание" или "специфичное распознавание" означает, что антитело обладает специфичной иммунореактивностью по отношению к антигенной детерминанте или эпитопу и не является иммунореактивным по отношению к другим антигенным детерминантам или эпитопам. Антитело, которое (иммуно)специфично связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами с более низкой аффинностью, как определено, например, посредством радиоиммунных анализов (RIA), иммуноферментных анализов (ELISA), BIACORE или других анализов, известных из уровня техники. Антитела или их фрагменты, которые специфично связываются с антигеном, могут характеризоваться перекрестной реактивностью с родственными антигенами, несущими такой же эпитоп. Предпочтительно, антитела или их фрагменты, которые специфично связываются с антигеном, не проявляют перекрестную реактивность с другими антигенами.

Используемый в данном документе термин "эпитоп" означает ту часть антигена, с которой контактируют петли CDR антитела. "Структурный эпитоп" состоит из приблизительно 15-22 контактных остатков на поверхности антигена и включает много аминокислотных остатков, которые контактируют с большой группой остатков в CDR, совместно именуемых паратопом антитела. Непосредственный контакт между остатками эпитопа и паратопа осуществляется посредством электростатических сил, таких как водородные связи, солевые мостики, ван-дер-ваальсовы силы на гидрофобных поверхностях и геометрическая комплементарность. Зона взаимодействия имеет также связанные молекулы воды или другие кофакторы, которые способствуют специфичности и аффинности взаимодействий антиген-антитело. Энергия связывания комплекса антиген-антитело в основном опосредована небольшой совокупностью контактных остатков в зоне взаимодействия эпитопа-паратопа. Данные "остатки, важные с точки зрения энергии связывания" часто находятся в центре зоны взаимодействия эпитопа-паратопа и составляют функциональный эпитоп. Контактные остатки на периферии зоны взаимодействия, как правило, вносят незначительные вклады в энергию связывания; при этом их замены зачатую слабо влияют на связывание с антигеном. Таким образом, связывание или функциональная активность эпитопа предусматривает небольшую совокупность остатков, важных с точки зрения энергии связывания, расположенных в центре структурного эпитопа, с которыми контактируют CDR, определяющие специфичность. Определение функционального эпитопа на антигенном белке можно произвести с использованием нескольких способов, включая аланин-сканирующий мутагенез, или путем определения кристаллической структуры антигена с использованием антитела. Эпитоп может быть линейным по своей природе или прерывистым эпитопом, например конформационный эпитоп, который образован посредством пространственных взаимоотношений между несмежными аминокислотами антигена, а не линейным рядом аминокислот. Конформационный эпитоп предусматривает эпитопы, возникшие вследствие укладки антигена, при которой аминокислоты из различных участков линейной последовательности антигена находятся в непосредственной близости в 3-мерном пространстве. Для прерывистых эпитопов возможно получить связывание одного или нескольких линейных пептидов с уменьшенной аффинностью к так называемому частичному эпитопу, например, распределенному по разным областям последовательности белка (Cragg M.S. (2011) Blood 118 (2):219-20).

Используемый в данном документе термин "аффинность" относится к степени силы связывания отдельного эпитопа или частичного эпитопа с CDR связывающей молекулы, например молекулы иммуноглобулина; см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) на стр. 27-28. Используемый в данном документе термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между популяцией иммуноглобулинов и антигеном, т.е. к объединенной силе функционального взаимодействия смеси иммуноглобулинов с антигеном; см., например, Harlow на стр. 29-34. Авидность связана как с аффинностью отдельных молекул иммуноглобулина в популяции со специфичными эпитопами, так и с валентностью иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между бивалентным моноклональным антителом и антигеном с высокоповторяющейся структурой эпитопа, например полимером, будет характеризоваться высокой авидностью. Аффинность или авидность антитела к антигену можно определить экспериментально с использованием подходящего способа; см., например, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" в *Fundamental Immunology*, Paul W.E., Ed., Raven Press New York, N.Y. (1984), Kuby, Janis *Immunology*, W.H. Freeman and Company New York, N.Y. (1992), и способов, описанных в данном документе. Общие методики измерения аффинности антитела к антигену включают ELISA, RIA и поверхностный плазмонный резонанс. Измеренная аффинность определенного взаимодействия антитело-антиген может варьироваться при измерении в разных условиях, например концентрация солей, pH. Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров, например KD, IC50, предпочтительно проводят со стандартными растворами антитела и антигена и стандартным буфером.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты или их варианты по настоящему изобретению можно также описать или определить с точки зрения их способности специфично обнаруживать присутствие

антигена. Термин "обнаруживать" или "обнаружение" используют в наиболее широком смысле, так что он охватывает количественные, полуколичественные или качественные измерения в отношении целевой молекулы. Согласно одному аспекту антитела, описанные в данном документе, могут обеспечивать только определение наличия или отсутствия тау-полипептида в биологическом образце, например, посредством иммуногистохимической методики, и, таким образом, тау-полипептид является поддающимся обнаружению или, в качестве альтернативы, не поддающимся обнаружению в образце, как определено посредством данного способа.

Используемый в данном документе термин "фосфоспецифичное антитело" или "фосфозависимое антитело" означает специфичное антитело, в котором по меньшей мере часть или целый эпитоп основан на фосфорилированном аминокислотном остатке. Фосфоспецифичное или фосфозависимое антитело не обнаруживает нефосфорилированный антиген. Термин "фосфоселективное антитело" означает специфичное антитело, которое предпочтительно связывается с фосфорилированным остатком и имеет более высокую аффинность к фосфорилированному, чем к нефосфорилированному антигену. Термин "нефосфоселективное антитело" означает специфичное антитело, которое предпочтительно связывается с нефосфорилированным остатком и имеет более высокую аффинность к нефосфорилированному, чем к фосфорилированному антигену. В некоторых вариантах осуществления антитела к тау-белку по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты являются нефосфоспецифичными.

Термин "полинуклеотид" предназначен для охвата как единичной нуклеиновой кислоты, так и множества нуклеиновых кислот, и относится к выделенной молекуле или конструкции нуклеиновой кислоты, например информационной РНК (mRNA) или плазмидной ДНК (pDNA). Полинуклеотид может содержать обычную фосфодиэфирную связь или нетрадиционную связь (например, амидную связь, такую как обнаруженная в пептидных нуклеиновых кислотах (PNA)). Термин "молекула нуклеиновой кислоты" относится к любой одной или нескольким частям нуклеиновой кислоты, например фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде. Под "выделенной" нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом подразумевают молекулу нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была извлечена из ее нативной окружающей среды. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий антитело, содержащийся в векторе, считается выделенным для целей настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В случае ДНК полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, обычно может содержать промотор и/или другие элементы контроля транскрипции или трансляции, функционально связанные с одной или несколькими кодирующими областями. Функциональная связь наблюдается, когда область, кодирующая продукт гена, например полипептид, ассоциирована с одним или несколькими регуляторными последовательностями таким образом, чтобы экспрессия продукта гена находилась под влиянием или контролем регуляторной последовательности(ей). Таким образом, промоторная область будет функционально связанной с нуклеиновой кислотой, которая кодирует полипептид, если промотор был способен к осуществлению транскрипции этой нуклеиновой кислоты. Промотор может являться клеточноспецифичным промотором, который управляет транскрипцией ДНК на существенном уровне только в предварительно определенных клетках. Другие элементы контроля транскрипции, кроме промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминирования транскрипции, могут быть функционально связанными с полинуклеотидом для управления клеточноспецифичной транскрипцией. В данном документе раскрыты подходящие промоторы и другие области контроля транскрипции.

Используемые в данном документе термины "лечить" или "лечение" относятся к терапевтическому лечению, а также профилактическим или превентивным мерам, где целью является предупреждение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как развитие паркинсонизма или болезни Альцгеймера. Благоприятные или желательные клинические результаты включают без ограничения ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, отсрочку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение состояния заболевания и ремиссию (либо частичную, либо полную), которые являются либо поддающимися обнаружению, либо не поддающимися обнаружению. "Лечение" также может означать продление выживания по сравнению с ожидаемой выживаемостью без получения лечения. Нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже имеются состояние или расстройство, а также лиц, склонных к развитию состояния или расстройства, или тех, у кого необходимо предотвратить проявление состояния или расстройства. Используемый в данном документе термин "лекарственный препарат" относится к средству, используемому для лечения нежелательного физиологического изменения или расстройства.

Под "субъектом", или "индивидуумом", или "животным", или "пациентом", или "млекопитающим" подразумевается любой субъект, в частности субъект, являющийся млекопитающим, например пациент-человек, для которого необходимы диагностика, прогнозирование, предупреждение или терапия.

Описание.

Тау-белок является часто встречающимся белком центральной и периферической нервной системы, характеризующимся множеством широко известных изоформ. В CNS человека по причине альтернатив-

ного сплайсинга существуют шесть основных изоформ тау-белка, которые варьируются по размеру от 352 до 441 (Hanger et al. Trends Mol. Med., 15:112-9, 2009). Эти изоформы отличаются одна от другой по подвергнутому регуляции включению 0-2 N-концевых вставок и 3 или 4 tandemно расположенных повторов, связывающихся с микротрубочками, и при этом они упоминаются как ON3R (SEQ ID NO: 6), 1N3R (SEQ ID NO: 4), 2N3R (SEQ ID NO: 2), ON4R (SEQ ID NO: 5), 1N4R (SEQ ID NO: 3) и 2N4R (SEQ ID NO: 1). Используемый в данном документе термин "рекомбинантный тау-белок" относится к изоформе тау-белка с SEQ ID NO: 1, которая лишена фосфорилирования и других посттрансляционных модификаций. Тау-белок может быть рекомбинантно экспрессирован в больших количествах, например, в *E. coli*, бакуловирусе, млекопитающем или бесклеточных системах. "Рекомбинантный тау-белок" может быть рекомбинантно экспрессирован и очищен посредством стандартных способов (Barghorn et al., 2004, Meth. Mol. Biol., 35-51).

Тау-белок связывает микротрубочки и регулирует транспорт груза в клетках, процесс, который может модулироваться с помощью фосфорилирования тау-белка, которое наблюдается в случае многих из 79 потенциальных сайтов фосфорилирования серина (Ser) и треонина (Thr). Тау-белок подвергается высокому уровню фосфорилирования в ходе развития головного мозга. Степень фосфорилирования снижается в зрелом возрасте. Некоторые сайты фосфорилирования расположены в пределах доменов связывания микротрубочек тау-белка, и было показано, что повышение уровня фосфорилирования тау-белка приводит к отрицательной регуляции связывания микротрубочек. Например, Ser262 и Ser396, которые расположены в пределах мотивов связывания микротрубочек или примыкают к ним, являются гиперфосфорилированными в тау-белках аномальных спаренных спиральных филаментов (PHF), основном компоненте нейрофибриллярных клубков (NFT) в головном мозге пациентов с AD. PHF являются филаментными агрегатами тау-белков, которые являются аномально гиперфосфорилированными и могут быть окрашены специфичными антителами к тау-белку и обнаружены посредством световой микроскопии. То же самое справедливо и для так называемых прямых филаментов тау-белка. PHF образуют перекрученные ленты, состоящие из двух филаментов, перекрученных один вокруг другого с периодичностью приблизительно 80 нм. Эти патологические особенности обычно называют "тау-белок-патологией", "таупатологией" или "патологией, связанной с тау-белком". Для более подробного описания нейропатологических особенностей таупатий см. Lee et al., Annu. Rev. Neurosci., 24 (2001), 1121-1159 и Gotz, Brain. Res. Rev., 35 (2001), 266-286, содержание раскрытия которого включено в данный документ посредством ссылки. Физиологический тау-белок стабилизирует микротрубочки в нейронах.

Патологическое фосфорилирование приводит к локализации и агрегации аномального тау-белка, который вызывает дестабилизацию микротрубочек и нарушение клеточного транспорта. Агрегированный тау-белок является нейротоксичным *in vitro* (Khlistunova et al., J. Biol. Chem., 281 (2006), 1205-1214). Разновидности, точно являющиеся нейротоксичными, остаются неустановленными, однако, так же, как и механизм(ы), посредством которых они приводят к гибели нейронов. Агрегаты тау-белка можно наблюдать в качестве главного компонента нейрофибриллярных клубков (NFT) при многих таупатиях, таких как болезнь Альцгеймера (AD), лобно-височные деменции, надъядерный паралич, болезнь Пика, заболевание, характеризующиеся появлением аргирофильных зерен (AGD), кортикобазальная дегенерация, FTDP-17, болезнь Паркинсона, деменция боксеров (обзор в Gendron and Petrucelli, Mol. Neurodegener. 4:13 (2009)). Помимо этих наблюдений, появляется доказательство того, что гибель нейронов, опосредованная тау-белком, может наблюдаться даже при отсутствии образования клубков. Растворимые разновидности фосфо-тау-белка присутствуют в CSF (Aluise et al., Biochim. Biophys. Acta., 1782 (2008), 549-558). Агрегаты тау-белка могут передавать неправильно уложенное состояние с внешней стороны во внутреннюю часть клетки и передавать его между клетками, которые совместно культивируются (Frost et al., J. Biol. Chem., 284 (2009), 12845-12852).

Помимо участия в нейродегенеративных таупатиях, наблюдались изменения в фосфорилировании тау-белка во время и после ишемии/реперфузии и после травмы головы вследствие удара, что свидетельствует о том, что тау-белок играет важную роль в нейрональном повреждении и клинической патофизиологии нейроваскулярных расстройств, таких как ишемический инсульт (Zheng et al., J. Cell. Biochem., 109 (2010), 26-29), а также изменения тау-белка обнаружены при хронической травматической энцефалопатии, таупатии у спортсменов, получивших сотрясение головного мозга, и военных ветеранов с черепно-мозговой травмой (TBI).

Антитела к тау-белку, раскрытые в данном документе, специфично связываются с тау-белком и его эпитопами и с различными конформациями тау-белка и его эпитопов. Например, раскрытые в данном документе антитела, которые специфично связывают тау-белок, обнаружены в нормальном головном мозге взрослого человека. В одном примере антитело к тау-белку, раскрытое в данном документе, связывается с тау-белком или его эпитопом и не демонстрирует связывания с другими белками, превышающего фоновый уровень приблизительно в 3 раза. Антитело, которое "специфично связывается" или "селективно связывается" с конформером тау-белка, относится к антителу, которое не связывается со всеми конформациями тау-белка, т.е. не связывается по меньшей мере с одним другим конформером тау-белка, таким как рекомбинантный тау-белок.

Вариабельные домены химерного моноклонального антитела к тау-белку по настоящему изобрете-

нию происходят из группы здоровых субъектов-людей, у которых проявляется специфичный иммунный ответ по отношению к тау-белку. Антитела к тау-белку по настоящему изобретению можно также называть "антителами, полученными от человека" для того, чтобы подчеркнуть, что эти антигенсвязывающие области антитела действительно были экспрессированы субъектами и не были выделены, например, из человеческого иммуноглобулина, экспрессирующего фаговую библиотеку, что до сих пор являлось единственным обычным способом попытки получения антител, подобных человеческим антителам. Например, антитела по настоящему изобретению отличаются от mAb AT8, MC1 и AT100 тем, что они являются антителами, полученными от человека.

Настоящее изобретение предусматривает моноклональные антитела, при этом антитела а) связывают тау-белок в нормальной ткани головного мозга человека и б) не связывают тау-белок в ткани головного мозга человека с AD. В некоторых вариантах осуществления антитела: а) образуют иммунный комплекс с тау-белком в ткани нормального (т.е. здорового) головного мозга человека и б) не образуют иммунный комплекс с тау-белком в ткани головного мозга человека с AD.

Антитела к тау-белку по настоящему изобретению можно, например, охарактеризовать по их связывающим свойствам в отношении рекомбинантного тау-белка посредством ELISA. Рекомбинантный тау-белок, полученный посредством очистки из *E.coli*, характеризуется высоким уровнем растворимости благодаря его гидрофильным свойствам. У него отсутствует фосфорилирование остатков Ser, Thr и Tyr, что является характерным для тау-белка, наблюдаемого при таупатиях. В одном примере человеческие антитела к тау-белку, раскрытые в данном документе, специфично связывают рекомбинантный тау-белок в ходе ELISA.

В одном варианте осуществления было показано, что антитело к тау-белку по настоящему изобретению специфично связывается с нефосфорилированным тау-пептидом с SEQ ID NO: 325 или SEQ ID NO: 331, или SEQ ID NO: 382, или SEQ ID NO: 458, или SEQ ID NO: 386. В дополнительном варианте осуществления было показано, что антитело к тау-белку по настоящему изобретению специфично связывается с фосфорилированными пептидами, если серины в положениях 316, 61 или треонин в положении 63 являются нефосфорилированными.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитела к тау-белку, раскрытые в данном документе, специфично связывают тау-пептид в ходе ELISA с использованием пептидов. В одном варианте осуществления антитело к тау-белку связывается с тау-пептидом, например

HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHPGGGQVEVKSEKLDLDFKDRVQSKIGSLDNIT
HVPGGGNK

(SEQ ID NO: 331), что соответствует аминокислотам 299-369 tau441. В другом варианте осуществления антитело к тау-белку связывается с тау-пептидом, например

GLKESPLQPTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGTTA

(SEQ ID NO: 325), что соответствует аминокислотам 42-103 tau441. В другом примере антитело к тау-белку связывается с тау-пептидом, например TEDGSEEPGSETSDAKSTPT (SEQ ID NO: 382), что соответствует аминокислотам 52-71 tau441. В другом варианте осуществления антитело к тау-белку связывается с тау-пептидом, например HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG (SEQ ID NO: 458), что соответствует аминокислотам 299-323 tau441. В другом примере антитело к тау-белку связывается с тау-пептидом, например EGAPGKQAAQPHTEIPEGTTA (SEQ ID NO: 386), что соответствует аминокислотам 82-103 tau441. Антитело к тау-белку по настоящему изобретению не похоже на ранее раскрытые моноклональные антитела человека к тау-белку (US 20130295021), которые, как сообщалось, связываются с различными тау-пептидами.

Моноклональные антитела NI-105.4E4, NI-105.4A3 и NI-105.4E4 связываются с пептидами 329-351+387-397, 337-343 и 35-49 tau441 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению являются химерными.

В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом, содержащим антигенсвязывающую переменную область из антитела человека, которая специфично связывается с тау-белком, и рекомбинантную константную область IgG1 человека, при этом химерное антитело является отличным от антитела человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом, содержащим антигенсвязывающую переменную область из антитела человека, которая специфично связывается с тау-белком, и рекомбинантную константную область IgG1 человека, при этом константная область химерного антитела является отличной от константной области антитела человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом, содержащим встречающуюся в природе антигенсвязывающую переменную область человека, которая специфично связывается с тау-белком, и рекомбинантную константную область антитела IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом, при этом антитело содержит встречающиеся в природе переменные области легкой и тяжелой цепи из антитела человека и константные области тяжелой и легкой цепи рекомбинантного IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом, при этом химерное антитело содержит переменные области тяжелой и легкой цепи из встречающегося в природе антитела

человека и константные области тяжелой и легкой цепи рекомбинантного IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом, содержащим вариабельные области тяжелой и легкой цепи из антитела человека и константные области тяжелой и легкой цепи рекомбинантного IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело является не встречающимся в природе вариантом моноклонального антитела человека.

В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с отложениями тау-белка, обработанными фосфатазой, в головном мозге человека с AD. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитела распознают тау-белок в головном мозге с AD после обработки фосфатазой. В некоторых вариантах осуществления антитела образуют иммунный комплекс с отложениями тау-белка в ткани человека с AD, обработанной фосфатазой.

Антитела к тау-белку по настоящему изобретению можно, например, охарактеризовать по их связывающим свойствам в отношении PHF-тау-белка посредством ELISA. Антитела к PHF-тау-белку клон AT8 связываются с PHF-тау-белком и широко используются для обнаружения PHF-тау-белка в нейрофибриллярных клубках в образцах от пациентов с болезнью Альцгеймера. AT8 является фосфороспецифичным моноклональным антителом и связывается с фосфорилированным Ser202 и Thr 205 PHF-тау-белка, и при этом согласно многим публикациям оно используется в ELISA, иммуногистохимии, иммуноблоттинге, вестерн-блоттинге и подобных применениях. Клон AT8 распознает тау-белок при болезни Альцгеймера, а также PHF-тау-белок в ходе ELISA и не связывает нефосфорилированный тау-белок от здоровых индивидуумов или рекомбинантный тау-белок. В одном варианте осуществления моноклональное антитело к тау-белку по настоящему изобретению не связывается с PHF-тау-белком в ходе ELISA. В другом варианте осуществления моноклональное антитело к тау-белку по настоящему изобретению связывается с дефосфорилированным PHF-тау-белком в ходе ELISA.

Антитела к тау-белку по настоящему изобретению можно охарактеризовать по их связывающим свойствам в отношении PHF-тау-белка и рекомбинантного тау-белка посредством вестерн-блоттинга. При нейродегенеративных расстройствах в агрегации тау-белков с образованием PHF участвует несколько механизмов (фосфорилирование, убиквитинирование, ацетилирование, окисление, гликирование) (Martin L. et al., *Neurochem. Int.*, 58(4):458-71, 2011). Эти патологические тау-белки визуализируются в ходе вестерн-блоттинга как три основные полосы от 55 до 69 кДа и минорная полоса в 74 кДа. Тау-белок 55 является результатом фосфорилирования самой короткой изоформы (SEQ ID NO: 6), тау-белок 64 - фосфорилирования вариантов тау-белка с одним кассетным экзоном (SEQ ID NO: 4 и/или SEQ ID NO: 5), тау-белок 69 - фосфорилирования вариантов тау-белка с двумя кассетными экзонами (SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3). Фосфорилирование самой длинной изоформы тау-белка (SEQ ID NO: 1) приводит к образованию дополнительного гиперфосфорилированного варианта - тау-белка 74. В некоторых вариантах осуществления антитела к тау-белку по настоящему изобретению связываются с PHF-тау-белком и рекомбинантным тау-белком в ходе вестерн-блот-анализа и не связываются с PHF-тау-белком в ходе ELISA.

В некоторых вариантах осуществления антитело а) связывает денатурированный PHF-тау-белок и б) не связывает неденатурированный PHF-тау-белок.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывает неденатурированный PHF-тау-белок, обработанный фосфатазой. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с более высокой аффинностью с обработанным фосфатазой PHF-тау-белком, чем с PHF-тау-белком, выделенным из ткани человека-донора.

В некоторых вариантах осуществления антитело а) связывает PHF-тау-белок в ходе вестерн-блоттинга и d) не связывает PHF-тау-белок в ходе ELISA. В некоторых вариантах осуществления антитела связывают PHF-тау-белок, выделенный из ткани человека с AD, в ходе вестерн-блоттинга и б) не связывают PHF-тау-белок в ходе ELISA.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывает обработанный фосфатазой PHF-тау-белок в ходе ELISA. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с более высокой аффинностью с обработанным фосфатазой PHF-тау-белком, выделенным из ткани человека с AD, в ходе ELISA.

Антитела к тау-белку по настоящему изобретению можно использовать в иммуногистохимическом (ИHC) исследовании срезов ткани нормального головного мозга или головного мозга с AD и охарактеризовать посредством такого исследования. Антитела к фосфо-тау-белку, в частности, указывают на нейрофибриллярную патологию с высоким уровнем чувствительности и специфичности, в то время как в нормальном здоровом головном мозге обнаружение тау-белка не наблюдается. Клинико-патологические исследования продемонстрировали, что отложения или скопления фосфо-тау-белка более точно соответствуют клиническим признакам по сравнению со скоплениями амилоида- β , и при этом поэтапное прогрессирование от транзенторинальной до лимбической и до изокортикальной областей является основой для определения стадий AD [R.J. Castellani et al., *Acta Neuropathol. (Berl)*, 111, 503(2006); H. Braak and E. Braak, *Acta Neuropathol. (Berl)*, 82, 239 (1991)]. Моноклональные антитела к тау-белку, которые часто используются в иммуногистохимическом исследовании, включают AT8 (тау-белок p202/p205), AT180 (тау-

белок p231), AT270 (тау-белок p181), AT100 (pT212 и S214) и MC-1 (Mercken M. et al., 1992 *Acta Neuropatho* 84:265-272, Zheng-Fischhofer, 1998 *Eur. J. Biochem.*, 252:542-552, Goedert M. et al., 1994, *Biochem. J.*, 301:871-877). В одном варианте осуществления моноклональные антитела к тау-белку по настоящему изобретению обнаруживают тау-белок в нормальной ткани головного мозга человека и не обнаруживают отложения тау-белка в ткани головного мозга человека с AD. В другом примере моноклональные антитела к тау-белку по настоящему изобретению обнаруживают отложения тау-белка в дефосфорилированной или обработанной фосфатазой ткани головного мозга человека с AD.

Антитела к тау-белку можно использовать в иммуногистохимическом исследовании в отношении дополнительных таупатий, включающих прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Пика и другие, и охарактеризовать посредством такого исследования. Патологические филаментные включения тау-белка в PSP состоят из ошибочно фосфорилированных тау-белков, но при этом наблюдается преимущественное накопление аномальных изоформ тау-белка 4R. Панель моноклональных антител к тау-белкам, включая Alz50, Tau-2, T46, PHF-1, PHF-6, 12E8, PHF-1, RD4 и AT8, используют для характеристики отложений при PSP (*J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1998 (6):588-601). Все моноклональные антитела окрашивают внутринейрональные и глиальные включения, однако, 12E8 и PHF-6 окрашивают их с меньшей интенсивностью. Эти антитела обнаруживают разные эпитопы тау-белка, например фосфоспецифичные, специфичные к изоформе, а также обнаруживают отложения тау-белка в головном мозге с AD. RD3, моноклональное антитело к тау-белку, которое специфично обнаруживает изоформу тау-белка с 3 повторами, демонстрирует ограниченное ИHC обнаружение PSP, но интенсивно окрашивает отложения тау-белка в тканях головного мозга человека с AD. Ограниченное обнаружение PSP этим антителом обусловлено сниженными уровнями изоформы тау-белка с 3 повторами при PSP (De Silva R. et al., *Neuropath. and Appl. Neurobio.*, (2003) 29(3)288-302).

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую: а) CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 201, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 202 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 203, или б) CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 207, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 208 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 209, с) CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 222, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 223 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 224, d) CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 238, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 239 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 240, е) CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 243, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 244 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 245, f) CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 243, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 247 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 248, и g) CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 250, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 251 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 252, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 254, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 254 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 255.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, содержащую: а) CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 204, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 205 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 206, б) CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 210, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 211 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212, с) CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 225, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 226, d) CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 241, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 242, е) CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 246, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212, f) CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 249, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212, и g) CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 254, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 254 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 255.

В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из а) антитела, содержащего CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 201, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 202 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 203, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 204, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 205 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 206, б) антитела, содержащего CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 207, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 208 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 209, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 210, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 211 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212, с) антитела, содержащего CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 222, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 223 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 224, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 225, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 226, d) антитела, содержащего CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 238, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 239 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 240, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 241, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 242, е) антитела, содержащего CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 243, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 244 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 245, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 246, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212, f) антите-

ла, содержащего CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 243, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 247 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 248, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 249, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212 и г) антитела, содержащего CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 250, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 251 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 252, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 254, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 254 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 255.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 115, переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 119, переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 135, переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 147, переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 151, переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 155, переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 159. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 116, переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 120, содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 136, переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 148, содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 152, переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 156, содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 169.

В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с пептидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 325 и SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с пептидом, выбранным из группы, состоящей из 382, 458 и 386.

В некоторых вариантах осуществления было показано, что антитело к тау-белку по настоящему изобретению специфично связывается с эпитопом, содержащим D314, L315 и K317, или L315, K317 и P312, или P59, S61, E62, T63, D65 и K67 tau441.

В некоторых вариантах осуществления предложены антигенсвязывающие фрагменты вышеописанных антител.

Антигенсвязывающие фрагменты предпочтительно связываются с одним и тем же эпитопом. Моноклональные антитела к тау-белку и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с разными эпитопами в сравнении с эпитопами для известных человеческих антител к тау-белку, таких как, например, NI-105.4E4 и NI-105.4A3. Связывание с другим эпитопом подразумевает, что антитело связывается с другими критически важными аминокислотными остатками по сравнению с известными антителами. Дополнительно было показано, что антитела по настоящему изобретению являются нефосфоселективными.

В некоторых вариантах осуществления антитела действуют синергически, если применяются в комбинации с другими антителами, связывающими тау-белок. Используемый в данном документе термин "синергический" означает, что комбинированный эффект антител или антигенсвязывающих фрагментов, если их применяют в комбинации, превышает их аддитивные эффекты при отдельном применении. Способ расчета синергии осуществляют с помощью показателя аддитивности. Общее представление о показателе аддитивности (CI) было описано у Chou and Talalay (*Adv Enzyme Regul.*, 22:27-55, 1984).

В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты предназначены для применения в качестве лекарственного препарата и предпочтительно для применения в диагностике, терапевтическом и/или профилактическом лечении нейродегенеративных заболеваний. Человеческие антитела к тау-белку по настоящему изобретению или их фрагменты, включая Fab, (Fab')₂, scFv-фрагменты или антитела, содержащие антигенсвязывающие участки антител по настоящему изобретению, можно использовать для лечения, уменьшения или предупреждения симптомов у пациентов с нейродегенеративным заболеванием, которое предполагает накопление тау-белка или патологического тау-белка или агрегацию тау-белка в пределах головного мозга, например, у пациентов, страдающих AD, а также любой другой таупатией или другой патологией, связанной с тау-белком, при которой тау-белок может сверхэкспрессироваться. Без ограничения конкретной теорией предполагается, что антитела по настоящему изобретению могут проявлять благоприятный эффект за счет уменьшения или устранения патологического тау-белка или агрегации тау-белка и, следовательно, количества PHF-тау-белка в головном мозге. Антитела по настоящему изобретению можно использовать для лечения пациента-животного, относящегося к любой систематической группе. Примеры таких животных включают млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные. Например, антитела по настоящему изобретению пригодны для получения лекарственного препарата для лечения AD, где лекарственный препарат получают для введения в дозах, определенных в данном документе.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ лечения или уменьшения симптомов нейродегенеративного заболевания, которое предполагает агрегацию тау-белка у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела по настоящему изобретению в течение времени, достаточного для лечения или уменьшения симптомов нейродегенеративного заболевания. Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ уменьшения количества тау-белка у пациентов, нуждающихся в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела по настоящему изобретению в течение времени, достаточного для уменьшения количества тау-белка.

В любом из указанных выше вариантов осуществления нейродегенеративное заболевание, которое предполагает агрегацию тау-белка, является таупатией. Используемый в данном документе термин "таупатия" охватывает любое нейродегенеративное заболевание, которое предполагает патологическую агрегацию тау-белка в пределах головного мозга. В дополнение к семейной и спорадической AD, другими иллюстративными таупатиями являются лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальная дегенерация, болезнь Пика, прогрессирующий подкорковый глиоз, деменция, характеризующаяся только клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменция, характеризующаяся появлением аргирофильных зерен, комплекс боковой амиотрофический склероз-паркинсонизм-деменция, синдром Дауна, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца, миозит с включенными тельцами, болезнь Крейтцфельда-Якоба, мультисистемная атрофия, болезнь Ниманна-Пика типа C, прион-протеинцеребральная амилоидная ангиопатия, подострый склерозирующий лейкоэнцефалит, миотоническая дистрофия, негуанианная болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм и хроническая травматическая энцефалопатия, такая как деменция боксеров (болезнь боксеров) (Morris et al. *Neuron*, 70:410-26, 2011).

Поведенческий фенотип, связанный с тау-белком, включает когнитивные нарушения, ранее изменение личности и расторможенность, апатию, абулию, мутизм, апраксию, персеверацию, стереотипные движения/стереотипное поведение, гиперорализм, неорганизованность, неспособность планировать или организовывать последовательные задания, эгоизм/бесчувственность, антисоциальные черты, отсутствие эмпатии, запинание, неграмотную речь с частыми инверсионными ошибками, но относительно сохранившимся пониманием, нарушение понимания и нехватку словарного запаса, медленно прогрессирующую нестабильность походки, ретропульсию, замирание, частое падение, аксиальную ригидность, нечувствительную к леводопе, надъядерный паралич взора, подергивания глазных яблок с прямоугольным сигналом, медленные вертикальные саккады, псевдобульбарный синдром, апраксию конечностей, дистонию, потерю кортикальной чувствительности и тремор.

Пациенты, подлежащие лечению, включают индивидуумов, у которых не наблюдаются симптомы, с риском возникновения AD или другой таупатии, а также пациентов, у которых в настоящее время проявляются симптомы. Пациенты, подлежащие лечению, включают индивидуумов с известным генетически обусловленным риском возникновения AD, таким как семейный анамнез AD или присутствие генетических факторов риска в геноме. Типичными факторами риска являются мутации в белке-предшественнике амилоида (APP), особенно в положениях 717 и положениях 670 и 671 (мутации Hardy и Swedish соответственно). Другими факторами риска являются мутации в генах пресенилина, PS1, и PS2, и ApoE4, семейный анамнез гиперхолестеринемии или атеросклероза. Индивидуумов, которые в настоящее время страдают AD, можно отличить от индивидуумов с типичной деменцией по наличию факторов риска, описанных выше. Кроме того, доступен ряд диагностических тестов для выявления индивидуумов с AD. Они включают измерение уровней тау-белка и A β 42 в спинномозговой жидкости. Повышенные уровни тау-белка и пониженные уровни A β 42 означают наличие AD. Индивидуумов, страдающих AD, можно также диагностировать посредством критериев Ассоциации AD и родственных заболеваний.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ уменьшения количества тау-белка у пациентов, нуждающихся в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела к тау-белку по настоящему изобретению в течение времени, достаточного для уменьшения количества тау-белка. Пациенты, подлежащие лечению, могут страдать от болезни, ассоциированной со сверхэкспрессией тау-белка. Некоторые мутации, включая мутации в интроне 10, индуцируют повышенные уровни функционально нормальной изоформы тау-белка с четырьмя повторами, что приводит к нейродегенерации. Сверхэкспрессия изоформы человеческого тау-белка с четырьмя повторами, в особенности в нейронах трансгенной мыши, ведет к развитию аксональной дегенерации в головном мозге и спинном мозге. В модели зарегистрировали аксональную дилатацию с накоплением нейрофиламентов, митохондрий и везикул. Аксонопатия и сопутствующая дисфункция сенсомоторных способностей зависели от дозы трансгена. При помощи этих результатов было доказано, что всего лишь повышения концентрации изоформы тау-белка с четырьмя повторами достаточно для повреждения нейронов в центральной нервной системе без образования внутринейрональных нейрофибриллярных клубков (Spittaels et al., *Am. J. Pathology*, 155(6) 2153-2165, 1999).

Введение/фармацевтические композиции.

Антитела к тау-белку по настоящему изобретению пригодны для использования в качестве как терапевтического, так и профилактического средства для лечения или предупреждения нейродегенеративных заболеваний, которые предполагают накопление тау-белка и/или патологическую агрегацию тау-белка, таких как AD, или другие таупатии, или болезни, ассоциированные с тау-белком. У пациентов, у которых не наблюдаются симптомы, лечение можно начинать в любом возрасте (например, в возрасте приблизительно 10, 15, 20, 25, 30 лет). Как правило, однако, не обязательно начинать лечение до тех пор, пациент не достигнет приблизительно 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение обычно предусматривает многократные дозы в течение некоторого периода времени. Лечение можно контролировать путем осуществления анализа ответов с участием антител, или активированных Т-клеток, или В-клеток в отношении терапевтического средства в зависимости от времени. Если уровень ответа понижается, назначается введение бустерной дозы.

При применении в профилактических целях фармацевтические композиции или лекарственные препараты вводятся пациенту, предрасположенному к AD или другой болезни с вовлечением тау-белка, или, в ином случае, с риском их развития, в количестве, достаточном для устранения или уменьшения риска, уменьшения тяжести или отсрочки начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, которые проявляются в ходе развития заболевания. При применении в терапевтических целях композиции или лекарственные препараты вводятся пациенту с подозрением на такое заболевание или пациенту, уже страдающему им, в количестве, достаточном для уменьшения, приостановки или отсрочки любых симптомов заболевания (биохимических, гистологических и/или поведенческих). Введение терапевтического средства может уменьшить или устранить умеренное когнитивное нарушение у пациентов, у которых еще не развилась патология, характерная для болезни Альцгеймера. Количество, достаточное для осуществления терапевтического или профилактического лечения, определяется как терапевтически или профилактически эффективная доза. В обеих из профилактического и терапевтического режимов композиции или лекарственные препараты, как правило, вводят в нескольких дозах до достижения достаточного иммунного ответа.

Антитела к тау-белку или их фрагменты по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с другими средствами, которые являются эффективными для лечения родственных нейродегенеративных заболеваний. В случае AD антитела по настоящему изобретению можно вводить в комбинации со средствами, которые уменьшают или предотвращают отложение бета-амилоида ($A\beta$). Возможно, что патологии с RHF-тау-белком и $A\beta$ являются синергичными. Таким образом, комбинированная терапия, нацеленная на устранение патологий, связанных как с RHF-тау-белком, так и с $A\beta$ одновременно, может быть более эффективна, чем целенаправленное воздействие на каждую из них по отдельности.

В случае болезни Паркинсона и родственных нейродегенеративных заболеваний также возникает способ терапии путем иммуномодуляции для устранения агрегированных форм белка α -синуклеина. Комбинированная терапия, которая нацелена на устранение как тау-белка, так и белка α -синуклеина одновременно, может быть более эффективной, чем целенаправленное воздействие на каждый белок по отдельности. В способах по настоящему изобретению "терапевтически эффективное количество" антитела для лечения или уменьшения тяжести симптомов таупатии можно определить с помощью стандартных методик исследования. Например, дозу антитела можно определить путем введения средства в соответствующих животных моделях, хорошо известных из уровня техники.

Кроме того, для определения оптимальных диапазонов доз можно необязательно использовать анализы *in vitro*. Специалисты в данной области техники могут сделать выбор конкретной эффективной дозы (например, с помощью клинических исследований) с учетом нескольких факторов. Такие факторы включают заболевание, которое подлежит лечению или предупреждению, связанные с ним симптомы, массу тела пациента, иммунный статус пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области техники. Точная доза для использования в составе также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания, и она должна быть определена в соответствии с заключением лечащего врача и обстоятельствами для каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать исходя из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на животных моделях. Способ введения антител по настоящему изобретению для терапевтического применения может представлять собой любой подходящий путь, посредством которого средство доставляют хозяину.

Фармацевтические композиции на основе этих антител пригодны для парентерального введения, например внутривенного, внутримышечного, интраперитонеального, внутривенного, подкожного, интраназального или интракраниального, или их можно вводить в спинномозговую жидкость головного мозга или спинного мозга.

Антитела по настоящему изобретению можно получить в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к разбавителю, вспомогательному средству, наполнителю или среде, с которыми вводится антитело. Такие фармацевтические среды могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла, полученные из нефти, животного, растительного

или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Например, можно использовать 0,4% солевой раствор и 0,3% глицин. Эти растворы являются стерильными и, как правило, не содержат твердые частицы. Они могут быть стерилизованы с помощью обычных, хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, которые необходимы для приблизительного соответствия физиологическим условиям, например, для доведения pH, и буферные вещества, стабилизирующие, загущающие, смазывающие и красящие вещества и т.д. Концентрация антител по настоящему изобретению в таком фармацевтическом составе может варьироваться в широком диапазоне, т.е. от менее чем приблизительно 0,5%, обычно приблизительно 1% или по меньшей мере приблизительно 1% вплоть до 15 или 20 вес.%, и при этом она будет выбрана, в первую очередь, исходя из требуемой дозы, значений объема текучей среды, значений вязкости и т.д., в зависимости от конкретного выбранного способа введения.

Лечение можно проводить в режиме введения с одной дозой или в режиме введения с несколькими дозами, при котором исходный курс лечения может состоять из 1-10 отдельных доз, с последующими другими дозами, вводимыми в последующие временные интервалы, которые необходимы для поддержания и/или усиления ответа, например, через 1-4 месяца вводят вторую дозу и, при необходимости, последующую(ие) дозу(ы) через несколько месяцев. Примеры приемлемых схем лечения включают: (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, достаточные для получения необходимых ответов, которые, как ожидается, приведут к уменьшению симптомов заболевания или уменьшению тяжести заболевания. Таким образом, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению для внутримышечной инъекции можно получить с содержанием 1 мл стерильной буферной воды и от приблизительно 1 нг до приблизительно 100 мкг, от приблизительно 50 нг до приблизительно 30 мкг или от приблизительно 5 мкг до приблизительно 25 мкг антитела по настоящему изобретению. Подобным образом, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению для внутривенной инфузии можно получить с содержанием приблизительно 250 мл стерильного раствора Рингера и от приблизительно 1 мкг до приблизительно 30 мкг или от приблизительно 5 мкг до приблизительно 25 мкг антитела по настоящему изобретению. Широко известны актуальные способы получения композиции для парентерального введения, которые более подробно описаны, например, в "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Антитела по настоящему изобретению можно лиофилизировать для хранения и повторно растворить в подходящем носителе непосредственно перед использованием. Было показано, что эта методика эффективна в случае антитела и других препаратов, содержащих белки, и при этом можно использовать известные из уровня техники методики лиофилизации и восстановления.

Способы диагностики и наборы.

Антитела по настоящему изобретению можно использовать в способах диагностики AD или другой таупатии у субъекта. Этот способ включает обнаружение у субъекта присутствия тау-белка с помощью диагностического реактива, такого как антитело или его фрагмент по настоящему изобретению. Тау-белок можно обнаружить в биологическом образце от субъекта (например, в крови, моче, спинномозговой жидкости) посредством приведения в контакт биологического образца с диагностическим реактивом, представляющим собой антитело, и обнаружения связывания диагностического реагента, представляющего собой антитело, с PHF-тау-белком в образце от субъекта. Анализы для осуществления обнаружения включают хорошо известные способы, такие как ELISA, иммуногистохимия, вестерн-блоттинг или *in vivo* визуализация. Иллюстративными диагностическими антителами являются антитела CBTAU-27.1, CBTAU-28.1, CBTAU-43.1, CBTAU-46.1, CBTAU-47.1, CBTAU-47.2 и CBTAU-49.1 по настоящему изобретению, и при этом они относятся к типу K IgG1.

Диагностические антитела или подобные реактивы можно вводить путем внутривенной инъекции в организм пациента или непосредственно в головной мозг любым подходящим путем, посредством которого средство доставляют хозяину, как проиллюстрировано выше. Доза антитела должна находиться в тех же диапазонах, что и для способов лечения. Как правило, антитело является меченым, хотя в некоторых способах первичное антитело с аффинностью к тау-белку является немеченым, и при этом вторичное средство для мечения используют для связывания с первичным антителом. Выбор метки зависит от средств обнаружения. Например, флуоресцентная метка подходит для оптического обнаружения. Использование парамагнитных меток подходит для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки также можно обнаружить с использованием PET или SPECT.

Диагностику осуществляют путем сравнения количества, размера и/или интенсивности для меченых тау-белков, накопления тау-белка, агрегатов тау-белка и/или нейрофибриллярных клубков в образце от субъекта или в субъекте с соответствующими исходными значениями. Исходные значения могут представлять собой средние уровни в популяции индивидуумов без заболевания. Исходные значения также могут отражать предыдущие уровни, определенные у одного и того же субъекта.

Способы диагностики, описанные выше, можно также использовать для контроля ответа субъекта на терапию путем обнаружения присутствия тау-белка у субъекта до, во время или после лечения. Изменение значений может быть по отношению к исходному уровню сигналов для ответа на лечение. Значе-

ния также могут временно изменяться в биологических жидкостях по мере того, как головной мозг очищается от патологического тау-белка.

Настоящее изобретение дополнительно относится к набору для осуществления вышеописанных способов диагностики и контроля. Обычно такие наборы содержат диагностический реактив, такой как антитела по настоящему изобретению, и необязательно детектируемую метку. Диагностическое антитело само по себе может содержать детектируемую метку (например, флуоресцентную молекулу, биотин и т.д.), которая поддается непосредственному обнаружению или обнаружению с помощью вторичной реакции (например, реакции со стрептавидином). В качестве альтернативы, можно использовать второй реагент, содержащий детектируемую метку, при этом второй реагент обладает специфичностью связывания с первичным антителом. В диагностический набор, пригодный для измерения уровня тау-белка в биологическом образце, можно включать антитела для набора, предварительно связанные с твердой фазой, например с лунками микротитрационного планшета.

Содержание всех приведенных в данной заявке документов (включая ссылки на литературные источники, выданные патенты, опубликованные заявки на патенты и одновременно находящиеся на рассмотрении заявки на патенты), таким образом, специально включены в данный документ посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Конструирование и мечение тау-пептида.

Гиперфосфорилирование тау-белка, которое приводит к высвобождению из микротрубочек и приводит к деполимеризации, является патологическим признаком, встречающимся при болезни Альцгеймера (AD) и других родственных таупатиях. По мере того как баланс свободного тау-белка к тау-белку, связанному с микротрубочками смещается в сторону первого, считается, что неассоциированный тау-белок накапливается в неправильно свернутом, агрегированном состоянии. Предполагается, что в процессе развития болезни тау-белок принимает различные конформации с прогрессированием от растворимых димерных и олигомерных форм к нерастворимым агрегатам более высокого порядка, таким как спаренные спиральные филаменты (PHF) и нейрофибриллярные клубки (NFT). Однако точные формы тау-белка, которые вносят вклад в развитие патологии и, следовательно, оптимальные для терапевтического целенаправленного воздействия, остаются неизвестными. Следовательно, попытки целенаправленного воздействия на тау-белок, способствующий развитию заболевания, часто ограничены выбором цели. В целях получения новых молекул, связывающих тау-белок, варибельные области антитела к тау-белку выделяли из человеческих В-клеток памяти с помощью фосфорилированных и нефосфорилированных тау-пептидов в качестве антигенов-приманок с использованием подхода с использованием одиночных клеток.

В собственном человеку спектре антител, вероятно, редко встречаются человеческие В-клетки памяти к тау-белку; поэтому было решено пометить приманки с тау-белком самыми яркими флуорофорами. Все тау-пептиды синтезировали с аминоконцевой группой биотина, с тем чтобы способствовать мечению двумя яркими флуорофорами, стрептавидином-APC или стрептавидином-PE (также называемыми тау-пептидными тетрамерами). Каждый тау-пептид метили обоими флуорофорами, с тем чтобы увеличить отношение сигнал-шум во время скрининга в отношении человеческих В-клеток памяти (подробно описано в примере 2) из образцов от доноров. Меченые тау-пептидные тетрамеры получали путем перемешивания биотинилированного пептида при молярном отношении пептида к стрептавидиновой метке 35:1 в течение ночи при 4°C посредством осторожного перемешивания. Свободный пептид удаляли путем разделения на колонке BioSpin 30 (Biorad). Все тау-пептидные тетрамеры хранили при 4°C в течение до 2 месяцев.

Пример 2. Выделение В-клеток памяти, специфичных к тау-белку, посредством FACS-сортировки с использованием меченых пептидных тетрамеров.

Моноклональные антитела к тау-белку выделяли из В-клеток памяти (CD22+CD19+CD27+IgG+), выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), которые были получены от доноров крови человека, у которых не проявляются симптомы (без AD), причем кровь была получена из Банка крови Сан-Диего и Службы нормальной донорской крови TSRI. Кроме того, образцы крови пациентов с AD получали от CRO, Quintiles, причем выделяли три антитела, подробно описанные в данной части документа. PBMC выделяли на Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) и криоконсервировали при 50 миллионах клеток на мл в 90% FBS и 10% DMSO. Аликвоту плазмы крови инактивировали нагреванием при 56°C и хранили при -20°C для последующей оценки реактивности плазмы крови.

Для каждого эксперимента по сортировке PBMC от 3-4 доноров оттаивали и перемещали в пробирки, содержащие предварительно нагретую полную RPMI (RPMI, 10% инактивированной нагреванием FBS и 1% пенициллина/стрептомицина), промывали и инкубировали по отдельности при 37°C в течение 16 ч. Объединенные PBMC обогащали в отношении зрелых В-клеток с помощью положительного отбора с использованием CD22+ магнитных шариков (Miltenyi Biotec). Клетки ресуспендировали в забуференном Tris солевом растворе с pH 7,4, содержащем 2 mM EDTA и 0,25% бычьего сывороточного альбумина фракции V (TBS Buffer). Клетки окрашивали внеклеточными маркерами IgG-FITC, CD19-PerCPy5.5 и CD27-PECy7 (все от BD Biosciences), для того чтобы пометить В-клетки. Отбирали десять миллионов

клеток и в качестве отрицательного контроля использовали конъюгаты, меченные биотином и стрептавидином. Оставшиеся клетки инкубировали с пулом из десяти тау-пептидных тетрамеров с двойной меткой (SA-APC и SA-PE) при 16,8 нМ каждого. Клетки инкубировали в течение 60 мин при 4°C с осторожным перемешиванием, дважды промывали и повторно суспендировали при 20 миллионах клеток на мл в TBS-буфере. Перед сортированием добавляли DAPI (Thermo Fisher) в качестве маркера живых клеток, и клетки сортировали с помощью Beckman Coulter MoFlo XDP. Образцы отрицательного контроля использовали для определения неспецифического связывания и соотношения сигнал-шум. CD19⁺, IgG⁺, CD27hi и положительные в отношении двух антигенов клетки собирали, и помещали в отдельные лунки 96-луночного планшета для ПЦР, и хранили при -80°C.

Пример 3. Выделение генов тяжелой и легкой цепи из одиночных В-клеток, специфичных к тау-белку.

Как подробно описано в примере 2, В-клетки памяти с реактивностью к тау-пептидным тетрамерам идентифицировали, выделяли и сортировали в отдельные микротитрационные лунки. cDNA тяжелой и легкой цепи выделяли посредством двухстадийного подхода, основанного на ПЦР, из отдельных В-клеток, и при этом последовательности переменного домена клонировали и экспрессировали *in vitro* в качестве полноразмерных рекомбинантных антител IgG1 и, таким образом, они представляли собой человеческие химерные антитела.

Синтез первой цепи cDNA.

Первую цепь комплементарной ДНК (cDNA) получали из одиночных отсортированных клеток в соответствии с протоколом производителя (Superscript III, Invitrogen Corp.) со следующими модификациями: в каждую лунку, содержащую одну В-клетку, добавляли 0,5 мкл 10% NP-40, 1,0 мкл олиго-dT, 1,0 мкл dNTP и инкубировали образцы при 65°C в течение 5 мин. После инкубирования образцы помещали на лед на 1 мин. В каждую лунку добавляли следующее: 2,0 мкл DTT, 4,0 мкл MgCl₂, 1,0 мкл Superscript RT и 0,5 мкл RNaseOut. Образцы инкубировали при 50°C в течение 50 мин с последующим инкубированием при 85°C в течение 5 мин.

Стадия I. Амплификация.

Для исходной ПЦР (стадия I) 2,5 мкл препарата cDNA использовали в качестве матрицы для амплификации тяжелой и легкой к- или λ-цепей. Использовали пулы праймеров, специфичных к лидерным областям тяжелой цепи антитела (праймеры CB-5'LVH, табл. 1), легкой к-цепи (праймеры CB-5'LVk, табл. 2) и легкой λ-цепи (праймеры CB-5' LVlam, табл. 3). На стадии I ПЦР-реакции использовали один обратный праймер, специфичный к CH1-области, СК и CL-областям тяжелой цепи, легкой к-цепи и легкой λ-цепи, соответственно.

Таблица 1. Прямые праймеры для VH на стадии I

ID праймера	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК (5'-3')	SEQ ID NO:
CB-5'LVH1a	ATGGACTGGACCTGGAGGTCCTC	7
CB-5'LVH1b	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTC	8
CB-5'LVH1c	ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTC	9
CB-5'LVH1d	ATGGACTGGACCTGGAGCATCC	10
CB-5'LVH2	GGACATACTTTGTTCACGCTCCTGC	11
CB-5'LVH3a	AGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGC	12
CB-5'LVH3b	AGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGC	13
CB-5'LVH3c	AGGTGTCCAGTGTGAGGTACAGC	14
CB-5'LVH4	GCAGCTCCAGATGGGTCTTG	15
CB-5'LVH5	TCAACCGCCATCCTCGCCCTC	16
CB-5'LVH6	GTCTGTCTCCTTCCTCATCTCCTGC	17
3' CgCH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC	18

Таблица 2. Прямые праймеры для VK на стадии I

ID праймера	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК (5'-3')	SEQ ID NO:
CB-5'LVk1a	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTC	19
CB-5'LVk1b	ATGAGGGTCCCTGCTCAGCTC	20
CB-5'LVk1c	ATGAGAGTCCTCGCTCAGCTC	21
CB-5'LVk2	TGGGGCTGCTAATGCTCTGG	22
CB-5'LVk3	CCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG	23
CB-5'LVk4	TCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGC	24
CB-5'LVk5	CTCCTCAGCTTCCTCCTCCTTTGG	25
CB-5'LVk6	AACTCATTTGGGTTTCTGCTGCTCTGG	26
3'Ck-Rev543	GTTTCTCGTAGCTGCTTTGCTCAGC	27
3'Ck-Rev494	GTGCTGTCTTGTGCTCCTGCTC	28
3'Ck-Rev	GCACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG	29

Таблица 3. Прямые праймеры для VL на стадии I (5'-3')

ID праймера	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК (5'-3')	SEQ ID NO:
CB-5' L Vlam1	CTCCTCGCTCACTGCACAGG	30
CB-5' L Vlam2	CTCCTCTCTCACTGCACAGG	31
CB-5' L Vlam3	CTCCTCACTCGGGACACAGG	32
CB-5' L Vlam4	ATGGCCTGGACCCCTCTCTG	33
CB-5' L Vlam5	ATGGCATGGATCCCTCTCTTCCTC	34
3'Cl -Rev	CACTAGTGTGGCCTTGTGGCTTG	35

Стадия II. Амплификация.

Для стадии II 2,5 мкл ПЦР-продукта из стадии I использовали в качестве матрицы для амплификации переменных областей тяжелой цепи и легких κ - или λ -цепей. Для получения ДНК из переменных областей использовали пул прямых и обратных праймеров, специально сконструированных для области каркаса 1 тяжелой цепи (праймеры pCB-IgG-VH и 3'SalI_{JH}, табл. 4), легкой κ -цепи (праймеры pCB-IgG-VK и 3'J_k, табл. 5) и легкой λ -цепи антитела (праймеры CB-VL и 3'Clam для стадии II, табл. 6). Кроме того, праймеры из стадии II были сконструированы для введения сайтов рестрикции XbaI (прямые праймеры VK и VL) и XhoI (праймеры 3'SalI_{JH}) для последующего клонирования. После реакций амплификации на стадии II ПЦР-продукты переменного домена тяжелой и легкой цепи анализировали с использованием 1% агарозного геля. Фрагменты переменной области тяжелой и легкой цепи очищали в соответствии с протоколом производителя (Qiagen) и использовали на стадии III ПЦР-реакции.

Таблица 4. Прямые и обратные праймеры для VH на стадии II

ID праймера	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК (5' - 3')	SEQ ID NO:
pCB-IgG-VH1a	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTC	36
pCB-IgG-VH1b	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTC	37
pCB-IgG-VH1c	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGGTTAGCTGGTGCAGTC	38
pCB-IgG-VH1d	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGGTCCAGCTTGTGCAGTC	39
pCB-IgG-VH2a	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGGTACCTTGAGGGAGTCTGG	40
pCB-IgG-VH2b	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGGTACCTTGAAGGAGTCTGG	41
pCB-IgG-VH3a	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTC	42
pCB-IgG-VH3b	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTC	43
pCB-IgG-VH3c	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC	44
pCB-IgG-VH3d	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGGTACAGCTGGTGGAGTCTG	45
pCB-IgG-VH4a	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGSTGCAGCTGCAGGAG	46
pCB-IgG-VH4b	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG	47
pCB-IgG-VH5	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTC	48
pCB-IgG-VH6	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG	49
pCB-IgG-VH7	CCTGTCTGGAATTCAGCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTG	50
3' SalI JH 1/2/4/5	TCGGGCCTCGAGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCAG	51
3' SalI JH3	TCGGGCCTCGAGACTCACCTGAAGAGACGGTGACCATTG	52
3' SalI JH6	TCGGGCCTCGAGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCGTG	53

Таблица 5. Прямые и обратные праймеры для VK на стадии II

ID праймера	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК (5' - 3')	SEQ ID NO:
pCB-IgG-VK1a	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGGACATCCAGATGACCCAGTCTCC	54
pCB-IgG-VK1b	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGGACATCCAGTTGACCCAGTCTCC	55
pCB-IgG-VK1c	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCC	56
pCB-IgG-VK2a	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGGATRTTGTGATGACTCAGTCTCC ACTC	57
pCB-IgG-VK3a	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC AG	58
pCB-IgG-VK3b	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGGAAATTGTGTTGACACAGTCTCC AG	59
pCB-IgG-VK3c	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGGAAATAGTGATGACGCAGTCTCC	60

	AG	
pCB-IgG-VK4	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGGACATCGTGATGACCCAGTCTCC	61
pCB-IgG-VK5	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGGAAACGACACTCACGCAGTCTCC	62
pCB-IgG-VK6	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC	63
	AG	
3'Jk1 Rev Ila	CGCAAAGTGCACTTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCCTGGC	64
3'Jk2 Rev Iib	CGCAAAGTGCACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCCTGGC	65
3'Jk4 Rev Ilc	CGCAAAGTGCACTTACGTTTGATATCCACTTTGGTCCCAGGGC	66
3'Jk3 Rev Ilc	CGCAAAGTGCACTTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCCTCCGC	67
3'Jk5 Rev Ild	CGCAAAGTGCACTTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCCCTGGC	68

Таблица 6. Прямые и обратные праймеры для VL на стадии II

ID праймера	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК (5'-3')	SEQ ID NO:
CB-VL1	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGAATTTTATGCTGACTCAGCCCCA CTC	69
CB-VL2	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGTCCTATGTGCTGACTCAGCC	70
CB-VL3	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGCAGTCTGTGCTGACGCAGCC	71
CB-VL4	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGCAGTCTGTGCTGACGCAGCC	72
CB-VL5	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCC	73
CB-VL6	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGTCTTCTGAGCTGACTCAGGACC	74
CB-VL7	CCGGTCTAGAGTTTTCCATGGCGTCCTATGAGCTGACTCAGCCACC	75
3'Clam для стадии II	CTCAGAGGAGGGYGGGAACAGAGTGAC	76

Стадия III. Амплификация: ПЦР с перекрывающимися праймерами.

Для стадии III фрагменты ДНК варибельной области тяжелой и легкой цепи, полученные на стадии II, соединяли в одну кассету с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами с использованием следующего: 1) к-линкера или λ-линкера (способ получения линкера см. ниже), который отжигается на 3'-конце фрагмента легкой цепи из стадии II и на 5'-конце фрагмента тяжелой цепи из стадии II и содержит константную область либо к-, либо λ-цепи, 2) прямого перекрывающегося праймера с сайтом рестрикции XbaI и 3) обратного праймера с сайтом рестрикции XhoI. В результате этой реакции получают ампликон из приблизительно 2400 п.о. или 2200 п.о. (т.е. кассету) для к- или λ-цепей, соответственно, состоящую из варибельной области легкой цепи, линкера и варибельной области тяжелой цепи. После амплификации продукт ПЦР-реакции с перекрывающимися праймерами очищали посредством ПЦР в соответствии с инструкциями производителя (Qiagen PCR Purification Kit).

Получение линкера.

Линкерный фрагмент амплифицировали при помощи pCB-IgG, причем вектор с двумя промоторами из CMV получали в лаборатории и использовали в качестве матрицы для экспрессии генов как тяжелой, так и легкой цепи, и при этом праймеры приведены в табл. 7. Длина линкерного фрагмента составляла 1765 или 1536 пар оснований для к- или λ-линкера, соответственно. к-линкер содержал, в направлении от 5' к 3', последовательность интрона, за которой следовала константная область к-цепи, поли(А)-последовательность терминации и последовательность промотора цитомегаловируса, обеспечивающая возможность экспрессии рекомбинантных антител с одного вектора. λ-линкер содержал константную область λ-цепи, поли(А)-последовательность терминации и последовательность промотора цитомегаловируса. Использовали стандартный обратный праймер (Linker_VH_HAVT20_pCB-IgG-R) и к-специфичный прямой праймер (Linker_CK_intron_pCB-IgG-F) (табл. 7).

Амплифицированный фрагмент отделяли с использованием 1% агарозного геля и очищали в соот-

ветствии с протоколом производителя (Qiagen Gel Extraction Kit).

Таблица 7. Линкер и перекрывающиеся праймеры

ID праймера	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (5'-3')	SEQ ID NO:
Linker_VH_HAVT20_pCB-IgG-R	GGCCATGCTGAATTCAGACAGG	78
Linker_CK_intron_pCB-IgG-F	AAACGTAAGTGCACCTTTCGCGCCGCTAGG	79
Linker_CL_intron_pCB-IgG-	ACTCTGTTCCCRCCCTCCTCTGAGG	80
F_opt		
pCB-overlap F	CCGGTCTAGAGTTTTCATGGCG	81
pCB-overlap R	TCGGGCCTCGAGACTCACC	82

Клонирование в вектор для экспрессии последовательностей млекопитающего.

После очистки продукта, полученного в результате ПЦР с перекрывающимися праймерами, фрагмент расщепляли посредством XhoI и XbaI и затем отделяли с использованием 1% агарозного геля. Полосу, соответствующую перекрывающейся кассете (~2,4 т.п.о.), очищали и лигировали в вектор экспрессии IgG1, pCB-IgG. Гены варибельных цепей антител субклонировали в этот вектор и осуществляли рекомбинантную экспрессию антител в виде IgG1 независимо от их первоначального (нативного) изотипа. (Пример аминокислотной последовательности константной области тяжелой цепи IgG1 показан в SEQ ID NO: 83 и аминокислотной последовательности константной области легкой к-цепи показан в SEQ ID NO: 84). Все трансформации проводили с использованием клеток DH5a Max Efficiency (Invitrogen Corp.) и выделяли с использованием 250 мкл SOC в течение 1 ч при 37°C. Приблизительно 100 мкл выделенных клеток высевали на чашки Петри с карбенициллином, дополненным 20 мМ глюкозы. Чашки Петри инкубировали в течение ночи при 37°C для обеспечения роста колоний. Оставшуюся смесь выделенных клеток культивировали с использованием 4 мл среды Super Broth (SB), дополненной 50 мкг/мл карбенициллина и инкубировали в течение ночи при 37°C со встряхиванием при 250 об/мин. На следующий день с каждой чашки Петри отбирали 5 колоний и выращивали в 3 мл среды SB, дополненной 50 мкг/мл карбенициллина в течение ночи при 37°C. Ночные культуры использовали для получения плазмидной ДНК (Qiagen).

Пример 4. Секвенирование последовательностей антител, идентификация последовательностей зародышевого типа и подтверждение реактивности в отношении тау-пептида в супернатанте трансфекции.

Для экспрессии IgG1 получали плазмидную ДНК из вышеупомянутых 4 мл культур с использованием минипрепов (Qiagen) и использовали для трансфицирования клеток 293Expi с применением ExpiFectamine согласно протоколам производителя (Invitrogen, Corp.). Продолжительность трансфекций составляла минимум 72 ч в 10 мл культурах, с тем чтобы обеспечить достаточную экспрессию IgG1. Клеточную среду собирали после трансфекций и центрифугировали, с тем чтобы удалить клетки и дебрис. Количественное определение в супернатантах проводили с использованием сенсорных наконечников с белком А на системе Octet Red (ForteBio). Каждый супернатант затем исследовали посредством ELISA с пептидом-приманкой, для того чтобы подтвердить присутствие антител с реактивностью в отношении тау-белка. Получали плазмидную ДНК с использованием минипрепа (Qiagen) из четырех отдельно отобранных культур из примера 3, и при этом тяжелые и легкие цепи секвенировали с использованием праймеров pC9_seq_HC-R (5'CATGTCACCGGGGTGTGG3')(SEQ ID NO: 85) и pC9_seq_LC-R (5'TCACAGGGGATGTTAGGGACA3')(SEQ ID NO: 86). Для последующих экспериментов выбрали один клон из четырех.

При помощи белковой и нуклеотидной последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи клонов антител CBTAU-7.1 (SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90), CBTAU-8.1 (SEQ ID NO: 91, 92, 93, 94), CBTAU-16.1 (SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98), CBTAU-18.1 (SEQ ID NO: 99, 100, 101, 102), CBTAU-20.1 (SEQ ID NO: 103, 104, 105, 106), CBTAU-22.1 (SEQ ID NO: 107, 108, 109, 110), CBTAU-24.1 (SEQ ID NO: 111, 112, 113, 114), CBTAU-27.1 (SEQ ID NO: 115, 116, 117, 118), CBTAU-28.1 (SEQ ID NO: 119, 120, 121, 122), CBTAU-41.1 (SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126), CBTAU-41.2 (SEQ ID NO: 127, 128, 129, 130), CBTAU-42.1 (SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134), CBTAU-43.1 (SEQ ID NO: 135, 136, 137, 138), CBTAU-44.1 (SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142), CBTAU-45.1 (SEQ ID NO: 143, 144, 145, 146), CBTAU-46.1 (SEQ ID NO: 147, 148, 149, 150), CBTAU-47.1 (SEQ ID NO: 151, 152, 153, 154), CBTAU-47.2 (SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158) и CBTAU-49.1 (SEQ ID NO: 159, 160, 161, 162) определяли новые CDR для выбранных антител к тау-белку (табл. 8).

Получали антитело к тау-белку CBTAU-7.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 87, и VL с SEQ ID NO: 88, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-8.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 91, и VL с SEQ ID NO: 92, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-16.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 95, и VL с SEQ ID NO: 96, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-18.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 99, и VL с SEQ ID NO: 100, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-20.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 103, и VL с SEQ ID NO: 104, и константную область IgG1 человека. Полу-

чали антитело к тау-белку CBTAU-22.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 107, и VL с SEQ ID NO: 108, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-24.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 111, и VL с SEQ ID NO: 112, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-27.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 115, и VL с SEQ ID NO: 116, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-28.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 119, и VL с SEQ ID NO: 120, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-41.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 123, и VL с SEQ ID NO: 124, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-41.2, содержащее VH с SEQ ID NO: 127, и VL с SEQ ID NO: 128, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-42.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 131, и VL с SEQ ID NO: 132, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-43.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 135, и VL с SEQ ID NO: 136, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-44.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 139, и VL с SEQ ID NO: 140, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-45.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 143, и VL с SEQ ID NO: 144, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-46.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 147, и VL с SEQ ID NO: 148, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-47.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 151, и VL с SEQ ID NO: 152, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU-47.2, содержащее VH с SEQ ID NO: 155, и VL с SEQ ID NO: 156, и константную область IgG1 человека. Получали антитело к тау-белку CBTAU 49.1, содержащее VH с SEQ ID NO: 159, и VL с SEQ ID NO: 160, и константную область IgG1 человека.

Таблица 8. Аминокислотные последовательности CDR варибельной области тяжелой и легкой цепи

Клон	Область аминокислот тау-белка	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
CBTAU 7.1	194-212	SYWMH (163)	RINSDGSDTNYADSVKG (164)	GRSYGFFDY (165)
		RASQIISNYLA (166)	GASSRAT (167)	QQYGTSPRT (168)
CBTAU 8.1	194-212	TYGMH (169)	VIWFDGNNKYYADSVKG (170)	DWWEAGCRPCYFF DY (171)
		KSSQSVLYSSNNKNYLA (1 72)	WASTRES (173)	QQYYSPLT (174)
CBTAU 16.1	204-221	DYWMS (175)	NINQDGSAAYYVDSVRG (176)	DAHYYDRNRNNYY YYFDF (177)
		RASQSVGANLA (178)	SASTRAT (179)	QQYNNWPRT (180)
CBTAU 18.1	200-217	SGNYYWS (181)	RMSSSGSTNYPNPSLKS (182)	ESGSSWQNHYYYY GMDV (183)
		KSSQSVLYSSNNKNYLA (1 72)	WASTRES (173)	QQYYSTPLT (184)
CBTAU 20.1	58-78	NYAMS (185)	GISSDGNFTFYADSVKG (186)	ESGRWGSGTLYGA HY (187)
		KSSQSLLYSSNNKNYLT (1 88)	WASTRES (173)	QQYYSSPLT (189)
CBTAU 22.1	406-429	DYNVH (190)	RISPNSGGTKYAQKFQG (191)	GHCDGTTCSTRAY (192)

		RSSQSLLHRSGHKYLH (193)	LGSNRAS (194)	MQTLQTPWT (195)
CBTAU 24.1	221-245	GYYLH (196)	WVNPRSGGTSYPPKFQG (197)	GRIPDVTAFDI (198)
		KSSESLLYDSNNKNYLA (1 99)	WASTRES (173)	QQYFSTPWT (200)
CBTAU 27.1	299-328	DYWTA (201)	IIYSGSDTRYHPSVQG (202)	LDARVDAGWQLDS (203)
		KSSQSVFSRDNNKNYLA (2 04)	WASSRES (205)	QHYFNTPHN (206)
CBTAU 28.1	52-71	NYWIG (207)	IIYPGSDTRYSPPFQG (208)	VGRPSKGGWFDP (209)
		ESSQTLLYSSNEKNYLA (210)	WASTPES (211)	QQYYNTPYT (212)
CBTAU 41.1	406-429	DSYMS (213)	YISRSSSHTNYADSVKG (214)	VQTTMIEGKTKLN YFDY (215)
		ESSHSLLYRSNNKNYLA (216)	WASTRES (173)	QQFYTTPYT (217)
CBTAU 41.2	406-429	DSYMS (213)	YISRSSSHTNYADSVKG (214)	VQTTMIEGKTKLN YFDY (215)
		ESSHSLLYRSNNKNYLA (218)	WASTRES (173)	QQFYTTPYT (217)
CBTAU 42.1	406-429	KAWMS (219)	RIKSKVDGETTDYAAPV RG (220)	LIHCDLSACLPHF (221)
		ESSHSLLYRSNNKNYLA (218)	WASTRES (173)	QQFYTTPYT (217)
CBTAU 43.1	299-328	NYWIA (222)	IIYPGSDTTYSPSFQG (223)	LPRTDGDNSIGYF EY (224)
		KSSQSVLYSSNSENYLA (225)	WASTRES (173)	QQYYSTPFT (226)
CBTAU 44.1	406-429	SYSMN (227)	YISSSTTTIYADSVKG (228)	VPAPRLGGSYTY (229)
		RASQSVSSSYLA	GASSRAT	QQYGTSPLT

		(230)	(167)	(231)
CBTAU 45.1	406-429	DAWMS (232)	RIKSKNVGETTDYAEHV RG (233)	GLGGGTYG (234)
		RSSAGLRNNDGDILLS (235)	RVSRRDS (236)	MRGPY (237)
CBTAU 46.1	82-103	IYEMN (238)	YITNRGSTIYYADSVKG (239)	PRIGARVFDV (240)
		KSSQTLLYKSNENYLA (241)	WASTRES (173)	QQYFTTALT (242)
CBTAU 47.1	52-71	DHWIG (243)	IIFPEDSDTRYSGSFEG (244)	VSVVRKGGWFDP (245)
		KSSQSLLYTSNNKNYLA (246)	WASTRES (173)	QQYYNSPYT (212)
CBTAU 47.2	52-71	DHWIG (243)	IIFPGDSDIRYSPSFEG (247)	VAVVRKGGWFDS (248)
		KSTQSLLWSANNKNYLA (249)	WASTRES (173)	QQYYNSPYT (212)
CBTAU 49.1	52-71	SYWIG (250)	IIYPDDSDTRYNASLEG (251)	RDRNCSGTTTCYPR WFDS (252)
		KSSQSFLFYSGNSKDFLA (253)	WASTRDS (254)	HQYHSTPLS (255)

Антитело CBTAU-7.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 163, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 164 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 165, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 166, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 167 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 168. Антитело CBTAU-8.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 169, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 170 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 171, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 172, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 174. Антитело CBTAU-16.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 175, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 176 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 177, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 178, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 179 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 180.

Антитело CBTAU-18.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 181, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 182 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 183, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 172, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 184. Антитело CBTAU-20.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 185, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 186 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 187, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 188, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 189. Антитело CBTAU-22.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 190, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 191 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 192, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 193, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 194 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 195. Антитело CBTAU-24.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 196, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 197 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 198, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 199, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 200. Антитело CBTAU-27.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 201, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 202 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 203, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 204, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 205 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 206. Антитело CBTAU-28.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 207, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 208 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 209, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 210, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 211 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212. Антитело CBTAU-41.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 213, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 214 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 215, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 216, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 217. Антитело CBTAU-41.2 содержит CDR1-

область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 213, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 214 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 215, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 218, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 174 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 217. Антитело CBTAU-42.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 219, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 220 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 221, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 218, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 217. Антитело CBTAU-43.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 222, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 223 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 224, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 225, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 226. Антитело CBTAU-44.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 227, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 228 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 229, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 230, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 167 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 231. Антитело CBTAU-45.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 232, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 233 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 234, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 235, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 236 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 237. Антитело CBTAU-46.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 238, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 239 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 240, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 241, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 242. Антитело CBTAU-47.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 243, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 244 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 245, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 246, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212. Антитело CBTAU-47.2 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 243, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 247 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 248, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 249, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212. Антитело CBTAU-49.1 содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 250, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 251 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 252, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 254, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 254 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 255.

Нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи моноклональных антител к тау-белку сравнивали с известными последовательностями зародышевого типа посредством IgBLAST, инструмента анализа последовательностей переменного домена иммуноглобулинов, доступного в NCBI (Nucleic. Acids Res. 2013 Jul;41(Web Server issue):W34-40). Выравнивания последовательностей областей каркаса H1 и L1 тяжелой и легкой цепи с их соответствующей предложенной последовательностью зародышевого типа и ПЦР-праймером приведены в табл. 9. Подтвержденные последовательности увеличены в масштабе для экспрессии и очистки (подробно описано в примере 5). Выбранные клоны размножали в 50 мл культуры, и при этом получали плазмидную ДНК с использованием миди-препа (набор Machery Nagel Midi Prep). Плазмидную ДНК затем использовали для трансфекции 30 мл культуры клеток 293Expi, как подробно описано в примере 5.

Таблица 9. Нуклеиновые кислоты каркаса H1 и L1, выровненные с последовательностью зародышевого типа и праймером

mAb	SEQ ID NO	Аминоконцевая последовательность белка и N-концевая последовательность нуклеиновой кислоты
CBTAU-7.1		
VH	87	(Q V Q L V E S)
pCB-IgG-VH1b	37	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTC
CBTAU-7.1VH	89	CAGGTCCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCT
IGHV3-74*01.	256	gAGGTgCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCT
VH нативного 7.1	257	(e V Q L V E)
VL	88	(D I V M T Q S P)

pCB-IgG-Vk4	61	GACATCGTGATGACCCAGTCTCC
CBTAU-7.1 VL	90	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACACCCTGTCTTTGTCTCCAGG GGAGAGAGCCACCCTCT
IGKV3- NL5*01	258	GAaATtGTGtTGACgCAGTCTCCAGcCACCCGTGTCTTTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCT
VL нативного 7.1	259	(e I V l T Q S P)
CBTAU-8.1		
VH	91	(Q V A L V E S)
pCB-IgG- VH3a	42	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTC
CBTAU-8.1 VH	93	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGAGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAC GTCCCTGAGACTCTCCT
IGHV3-33*01	260	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCtgGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAC GTCCCTGAGACTCTCCT
VH нативного 8.1	261	(Q V A L V E S)
VL	92	(E T T L T Q S P)
pCB-IgG-Vk5	62	GAAACGACACTCACGCAGTCTCC
CBTAU-8.1 VL	94	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATCA
IGKV4-1*01	262	GAcAtcgtgaTgACcCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATCA
VL нативного 8.1	263	(d i v m T Q S P)
CBTAU-16.1		
VH	95	(E V Q L V Q)
pCB-IgG-VH5	48	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
CBTAU-16.1 VH	97	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCT
IGHV3-64*01	264	GAGGTGCAGCTGGTGgAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCT
VH нативного 16.1	265	(E V Q L V e S)
VL	96	(E I V M T Q S P)
pCB-IgG-	60	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCGG

VK3c		
CBTAU-16.1VL	98	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCGGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCT
IGKV3-15*01	266	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCaGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCT
VL нативного 16.1	267	(E I V M T Q S P)
CBTAU-18.1		
VH	99	(Q V Q L L E S)
		No exact primer match
CBTAU-18.1 VH	101	CAGGTGCAGCTGTTGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAACCCCTCACA GACCCTGTCCCTCACCT
IGHV4-31*05	268	CAGGTGCAGCTGcaGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACA GACCCTGTCCCTCACCT
VH нативного 18.1	269	(Q V Q L q E S)
VL	100	(E I V L T Q S P)
pCB-IgG- VK3b	59	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAG
CBTAU-18.1 VL	102	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCAACATTA
IGKV4-1*01	262	GAcATcGTGaTGACcCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCAcCATcA
VL нативного 18.1	270	(d I V m T Q S P)
CBTAU-20.1		
VH	103	(Q V Q L V E S)
pCB-IgG- VH3d	45	CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTG
CBTAU-20.1 VH	105	CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCT
IGHV3-23*04	271	gAGGTgCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCT
VH нативного 20.1	272	(e V Q L V E S)
VL	104	(D I Q M T Q S P)

pCB-IgG-VK1a	54	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
CBTAU-20.1 VL	106	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATCA
IGKV4-1*01	262	GACATCgtGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATCA
VL нативного 20.1	273	(D I v M T Q S P)
CBTAU-22.1		
VH	107	(Q V Q L V Q S)
pCB-IgG-VH1a	36	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
CBTAU-22.1 VH	109	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC CCCAGTGAAGGTCTC
IGHV1-2*02	274	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC CtCAGTGAAGGTCTC
VH нативного 22.1	275	(Q V Q L V Q S)
VL	108	(D V V M T Q S P L)
		No Exact Primer match
CBTAU-22.1 VL	110	GATGTTGTGATGACGCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGG AGAGCCGGCCTCCATC
IGKV2-28*01	276	GATaTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGG AGAGCCGGCCTCCATC
VL нативного 22.1	277	(D i V M T Q S P L)
CBTAU-24.1		
VH	111	(Q V Q L V S G)
pCB-IgG-VH1d	39	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTC
CBTAU-24.1 VH	113	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC CTCAGTGAAGGTCTCC
IGHV1-3*01	278	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC CTCAGTGAAGGTtTCC
VH нативного 24.1	279	(Q V Q L V S G)

VL	112	(D I Q M T Q S P)
pCB-IgG-VK1a	54	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
CBTAU-24.1 VL	114	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
IGKV4-1*01	262	GACATCgtGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
VL нативного 24.1	280	(D I v M T Q S P)
CBTAU27.1		
VH	115	(Q V Q L V E S)
pCB-IgG-VH3a	42	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTC
CBTAU27.1 VH	117	CAGGTTcAGCTGGTGGAGTCTGGACCGGAGATGAGAAAGCCCGGGGA GTCTCTGAAAATTTC
IGHV5-51*01	281	gAGGTgCAGCTGGTGcAGTCTGGAgCaGAGgTGAAaAAAGCCCGGGGA GTCTCTGAAgATcTCC
VH нативного 27.1	282	(e V Q L V q S)
VL	116	(D I Q L T Q S P)
pCB-IgG-VK1b	55	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCC
CBTAU27.1 VL	118	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCAGATTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGCGGGCCACCATC
IGKV4-1*01	262	GACATCgtGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
VL нативного 27.1	283	(D I v m T Q S)P
CBTAU28.1		
VH	119	(Q V Q L Q Q S)
pCB-IgG-VH6	49	CAGGTaCAGCTgCAGCAGTCAG
CBTAU28.1 VH	121	CAGGTGCAGCTACAGCAGTCAGGAGCAGAAGTGAAAAAGCCCGGGGA GTCTCTGAAGATCTCC
IGHV5-51*01	281	gAGGTGCAGCTggtGCAGTctGGAGCAGAAGTGAAAAAGCCCGGGGA GTCTCTGAAGATCTCC
VH нативного	284	(e V Q L v Q S)

28.1		
VL	120	(D I Q M T Q S P)
pCB-IgG-VK1a	54	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
CBTAU28.1 VL	122	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
IGKV4-1*01	262	GACATCgtGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
VL нативного 28.1	285	(D I v M T Q S P)
CBTAU41.1		
VH	123	(E V Q L L E S)
pCB-IgG-VH3b	43	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTC
CBTAU41.1 VH	125	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGG GTCCCTGAGACTCTCC
IGHV3-11*06	286	cAGGTGCAGCTGgTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGG GTCCCTGAGACTCTCC
VH нативного 41.1	287	(q V Q L v E S)
VL	124	(D I Q M T Q S P)
pCB-IgG-VK1a	54	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
CBTAU41.1 VL	126	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGTCACCATC
IGKV4-1*01	262	GACATCgtGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGTCACCATC
VL нативного 41.1	288	(D I v M T Q S P)
CBTAU41.2		
VH	127	(E V Q L V Q S)
pCB-IgG-VH3b	43	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
CBTAU41.2 VH	129	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGG GTCCCTGAGACTCTCC
IGHV3-11*06	286	cAGGTGCAGCTGGTGgAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGG GTCCCTGAGACTCTCC

VH нативного 41.2	289	(q V Q L v E S)
VL	128	(A I Q L T Q S P)
pCB-IgG- VK1c	56	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCC
CBTAU41.2 VL	130	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGTCACCATC
IGKV4-1*01	262	gaCATCgtGaTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGTCACCATC
VL нативного 41.2	290	(d I v m T Q S P)
CBTAU42.1		
VH	131	(Q L V Q S E G)
pCB-IgG- VH1a-c	36	CAGCTGGTGCAGTC
CBTAU42.1 VH	133	CAGCTGGTGCAGTCTGAGGGAGGCCTGGCAGAGCCTGGGGGGTCCCT TAGACTC
IGHV3-15*01	291	CAGCTGGTGgAGTCTGgGGGAGGCCTGGCAGAGCCTGGGGGGTCCCT TAGACTC
VH нативного 42.1	292	(Q L V e S g g)
VL	132	(E I V L T Q S P)
pCB-IgG- VK3a	58	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAG
CBTAU41.1 VL	134	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGTCACCATC
IGKV4-1*01	262	GAcATcGTGaTGACcCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGTCACCATC
VL нативного 42.1	293	(d I V m T Q S P)
CBTAU43.1		
VH	135	(Q V Q L V Q S)
pCB-IgG- VH1a	36	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTC

CBTAU43.1 VH	137	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGA GTCTCTGAAGATCTCC
IGHV5-51*03 VH	294	gAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGA GTCTCTGAAGATCTCC
нативного 43.1	295	(e V Q L V Q S)
VL	136	(E I V L T Q S P)
pCB-IgG- VK3b	59	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAG
CBTAU43.1 VL	138	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
IGKV4-1*01	262	GAcATcGTGaTGACcCAGTCTCCAGCCTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
VL нативного 43.1	296	(d I V m T Q S P)
CBTAU44.1		
VH	139	(E V Q L V E S)
pCB-IgG- VH3c	44	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTC
CBTAU44.1 VH	141	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCC
IGHV3-48*01	297	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCC
VH нативного 44.1	298	(E V Q L V E S)
VL	140	(D I Q M T Q S)
pCB-IgG- VK1a	54	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
CBTAU44.1 VL	142	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTC
IGKV3-20*01	299	GAaATtgtGtTGACgCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTC
VL нативного 44.1	300	(e I v L T Q S)
CBTAU45.1		
VH	143	(E V Q L V E S)

pCB-IgG-VH3c	44	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTC
CBTAU45.1 VH	145	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGCCACCCTTGG ACAGCCGGCCTCCATC
IGHV3-15*02	301	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTAAAGCCTGGGGG GTCCCTTAGACTCTCC
VH нативного 45.1	302	(E V Q L V E S)
VL	144	(E I V L T Q S P)
pCB-IgG-VK3b	59	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAG
CBTAU45.1 VL	146	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGCCACCCTTGG ACAGCCGGCCTCCATC
IGKV2-30*01	303	GAtgTTGTGaTGActCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGCCACCCTTGG ACAGCCGGCCTCCATC
VL нативного 45.1	304	(d v V m T Q S P)
CBTAU46.1		
VH	147	(Q V Q L V E S)
pCB-IgG-VH3d	45	CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTG
CBTAU46.1 VH	149	CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGA GTCCCTGAGACTCTCC
IGHV3-48*03	305	gAGGTgCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGA GTCCCTGAGACTCTCC
VH нативного 46.1	306	(E V Q L V E S)
VL	148	(D I Q L T Q S P)
pCB-IgG-VK1b	55	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCC
CBTAU46.1 VL	150	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
IGKV4-1*01	262	GACATCgtGaTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
VL нативного 46.1	307	(D I v m T Q S P)

CBTAU47.1		
VH	151	(Q V Q L V Q S)
pCB-IgG-VH1a	36	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
CBTAU47.1 VH	153	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGTGGTGAAAAAGCCCGGGGA GTCTCTGAAGATCTC
IGHV5-51*01	308	gAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGTGGTGAAAAAGCCCGGGGA GTCTCTGAAGATCTC
VH нативного 47.1	309	(E V Q L V Q S)
VL	152	(A I Q L T Q S P)
pCB-IgG-VK1c	56	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCC
CBTAU44.1 VL	154	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
IGKV4-1*01	262	GaCATCgtGaTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
VL нативного 47.1	310	(d I v m T Q S P)
CBTAU47.2		
VH	155	(Q V Q L V E S)
pCB-IgG-VH3d	45	CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTG
CBTAU47.1 VH	157	CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGAGCAGAACTGAAAAAGCCCGGGGA GTCTCTGAAGATCTCC
IGHV5-51*01	281	gAGGTgCAGCTGGTGcAGTCTGGAGCAGAACTGAAAAAGCCCGGGGA GTCTCTGAAGATCTCC
VH нативного 47.2	311	(e V Q L V q S)
VL	156	(E I V M T Q S P)
pCB-IgG-VK3c	60	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAG
CBTAU44.1 VL	158	GAAATTGTGATGACCCAGTCTCCAGAGTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
IGKV4-1*01	262	GAcATcGTGATGACCCAGTCTCCAGAGTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
VL	312	(d I V M T Q S P)

НАТИВНОГО 47.2		
CBTAU49.1		
VH	159	(Q V Q L V Q S)
pCB-IgG- VH1a	36	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
CBTAU49.1 VH	161	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAAAAGCCGTGGGA GTCTCTGAAGATCTCC
IGHV5-51*03	294	gAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAAAAGCCGTGGGA GTCTCTGAAGATCTCC
VH нативного 49.1	313	(e V Q L V Q S)
VL	160	(E I V L T Q S P)
pCB-IgG-VK6	63	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAG
CBTAU49.1 VL	162	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
IGKV4-1*01	262	GACATcGTGaTGACcCAGTCTCCAGACTTCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATC
VL нативного 49.1	314	(d I V m T Q S P)

(Аминокислоты, приведенные выше.) Различия отмечены нижним регистром букв. Нативный относится к антителу.

Исследовали реактивность супернатантов IgG1, полученного в результате трансфекции, в отношении тау-пептидов посредством ELISA. Сначала 96-луночные планшеты с половинным объемом лунки для ELISA (Costar) покрывали 50 мкл бычьего актина (1 мкг/мл, Sigma) в качестве отрицательного контроля и антителом козы к F(ab)₂-фрагменту человека, очищенным аффинной хроматографией (2 мкг/мл, Jackson ImmunoResearch) для подтверждения получения антитела. Планшеты покрывали в TBS в течение ночи при 4°C. На следующий день планшеты промывали 5 раз TBS/0,05% Tween (TBS-T) и блокировали 150 мкл TBS-T плюс 2,5% BSA (блокирующий буфер) в течение 2 ч. Тау-пептиды захватывали на планшетах, покрытых стрептавидином (Pierce) в концентрации 0,43 мкМ в 100 мкл TBS. Тау-пептиды, используемые для настройки анализа ELISA, были такими же, как и приманки в соответствующем эксперименте по сортированию. Планшеты, покрытые тау-пептидом, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Все планшеты затем промывали 5 раз TBS/0,05% Tween, и блокировали 150 мкл и 300 мкл (только планшеты с тау-пептидом) блокирующего буфера, и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Супернатанты с IgG, полученным в результате трансфекции, разводили до 5 мкг/мл (исходя из количественной оценки при помощи Octet Red) и титровали в 5 раз в TBS/0,25% BSA. Мышиное антитело к актину (Sigma, № по кат. A3853) использовали в концентрации 1,25 мкг/мл в качестве положительного контроля для планшетов, покрытых бычьим актином. Коммерческие антитела использовали в концентрации 1 мкг/мл в качестве положительного контроля для анализа ELISA, включая моноклональное антитело AT8 (Thermo, MN1020), моноклональное антитело AT100 (Thermo, MN1060) и моноклональное антитело AT180 (Thermo, MN1040). Первичные антитела инкубировали в течение 2 ч. при комнатной температуре и промывали 5 раз в TBS-T. В конечном итоге, Fab-антитело козы к IgG человека или конъюгированное с HRP антитело козы к IgG мыши (Jackson Labs) использовали при 1:2000 и 1:4000, соответственно, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали 5 раз в TBS-T и проявляли субстратом для пероксидазы SureBlue Reserve TMB Microwell (KPL). Реакцию останавливали посредством добавления 50 и 100 мкл (планшеты с пептидами) TMB Stop Solution (KPL) и измеряли поглощение при 450 нм с использованием планшет-ридера для ELISA. Результаты для супернатантов с указанными выше активностями связывания затем повторно подтверждали в независимом исследовании посредством ELISA. После повторного подтверждения выбирали клон для последующей экспрессии IgG и очистки (пример 5).

Пример 5. Экспрессия IgG1 и очистка клонированных химерных mAb к тау-белку.

После скрининга посредством ELISA и подтверждения реактивности антител выбранные клоны экспрессировали как IgG1, как указано в примере 4. Среду для культуры клеток собирали и центрифуги-

ровали, чтобы удалить клетки, по прошествии от не менее 72 ч до не более 168 ч. Очищенные образцы надосадочной жидкости затем дважды пропускали через колонку с белком А на сефарозе (GE Healthcare Life Sciences) и промывали в 50 мл PBS. IgG затем элюировали 10 мл элюирующего буфера для IgG (Pierce) и нейтрализовали Tris с pH 8,0, а затем в течение ночи диализировали против PBS. Диализированные образцы концентрировали с использованием ультрацентрифужного блока с MWCO 10000 (Amicon) до конечного объема приблизительно 1 мл, и значения концентрации антител определяли с помощью сенсорных наконечников с белком А, используя IgG человека в качестве стандарта, на Octet Red384 (ForteBio). Очищенные антитела дополнительно подвергали контролю качества посредством осуществления SDS-PAGE в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях и посредством эксклюзионной хроматографии.

Пример 6. Связывание с IgG.

Реактивность по отношению к тау-пептидам.

IgG1, полученные и подвергнутые контролю качества, как описано выше, тестировали посредством ELISA в отношении их способности связываться с определенным(определенными) родственным(родственными) пептидом(пептидами), а также неродственным пептидом (табл. 10). 96-луночные планшеты для ELISA (Costar) или планшеты, покрытые стрептавидином (Pierce), покрывали соответственно антигеном (бычьим актином и антителом козы к F(ab)₂-фрагменту человека, очищенным аффинной хроматографией) или тау-пептидами, как подробно описано в примере 4. Очищенные IgG к тау-белку разводили до 5 мкг/мл в TBS, содержащем 0,25% BSA, и титровали в 5-кратных разведениях. Контрольные антитела и вторичные антитела использовали, как подробно описано в примере 4. Реактивность антител при 1 мкг/мл определяли посредством ELISA и оценивали как отсутствие связывания (-), слабую (-/+), среднюю (+) или сильную (++). (-) для среднего значения двух показателей O.D. при 450 нм < 0,3; (-/+) для > 0,5 и < 1,0; (+) для > 1,0 и < 1,5; (++) для > 1,5.

Таблица 10. Родственные и неродственные пептиды, используемые в ELISA

mAb	Пептид	Последовательность пептида (pX) обозначает фосфорилированную аминокислоту	SEQ ID NO	Результаты
CBTAU-7.1	ptau 194-212 (pS202, pT205)	RSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	315	+
	tau 194-212	RSGYSSPGSPGTPGSRRT	316	-
CBTAU-8.1	ptau 194-212 (pS202, pT205)	RSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	315	-/+
	tau 194-212	RSGYSSPGSPGTPGSRRT	316	-
CBTAU-16.1	ptau 204-221 (pT212, pS214)	GTPGSRSR (pT) P (pS) LPTPPTR	317	++
	tau 204-221	GTPGSRSRTPSLPTPPTR	318	++
CBTAU-18.1	ptau 200-217 (pS210)	PGSPGTPGSR (pS) RTPSLPT	319	-/+
	tau 200-217	PGSPGTPGSRRTPSLPT	320	-
	tau 186-253	GEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDL	321	-
CBTAU-20.1	ptau 58-76 (pS68, pT69)	EPGSETSDAK (pS) (pT) PTAEDVT	322	++
	ptau 59-78 (pT69, pT71)	PGSETSDAKS (pT) P (pT) AEDVTAP	323	++
	ptau 61-78 (pT71)	SETSDAKSTP (pT) AEDVTAP	324	-/+
	tau 42-103	GLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAPHTIEIPEGT TA	325	-
CBTAU-22.1	ptau 406-429 (pS416, pS422)	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	326	++
	tau 389-441	GAEIVYKSPVSGDTSRHLNVSTGSDIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL	327	-
CBTAU-24.1	ptau 221-245 (pT231, pS238)	REP KKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQT	328	++
	ptau 228-245 (pS238)	VVRTPPKSPS (pS) AKSRLQT	329	++
	ptau 225-245 (pS235, pS238)	KVAVVRTPPK (pS) PS (pS) AKSRLQT	330	++

	tau 186-253	GEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSL PTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQT APVPMDDL	321	++
CBTAU- 27.1	tau 299-369	HVPGGGSVQIVYKPVLDLSKVTSKCGSLGNI HHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLD NITHVPGGGNK	331	+
	ptau 194-212 (pS202,pT205)	RSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	315	-
CBTAU- 28.1	tau 42-103	GLKESPLQTPTEGSEEPGSETSDAKSTPT AEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGT TA	325	++
	ptau 257-272	KSKIG (pS) TENLKHQPGG	332	-
CBTAU- 41.1	ptau 406-429 (p416, p422)	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	326	+
	tau 389-441	GAEIVYKSPVVGSDTSPRHLSNVSTGSID MVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	327	-
CBTAU- 41.2	ptau 406-429 (p416, p422)	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	326	+
	tau 389-441	GAEIVYKSPVVGSDTSPRHLSNVSTGSID MVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	327	-
CBTAU- 42.1	ptau 406-429 (p416, p422)	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	326	++
	tau 389-441	GAEIVYKSPVVGSDTSPRHLSNVSTGSID MVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	327	-
CBTAU- 43.1	tau 299-369	HVPGGGSVQIVYKPVLDLSKVTSKCGSLGNI HHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLD NITHVPGGGNK	331	+
	ptau 194-212 (pS202,pT205)	RSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	315	-
CBTAU- 44.1	ptau 406-429 (p416, p422)	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	326	-/+
	tau 389-441	GAEIVYKSPVVGSDTSPRHLSNVSTGSID MVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	327	-
CBTAU- 45.1	ptau 406-429 (p416, p422)	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	326	++
	tau 389-441	GAEIVYKSPVVGSDTSPRHLSNVSTGSID MVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	327	-

CBTAU-46.1	tau 42-103	GLKESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAKSTPT AEDVTAPLVDEGAPGKQAAAPHTEIPEGT TA	325	+
	ptau 224-241 (pT231, pS235)	KKVAVVR (pT) PPK (pS) PSSAKS	333	-
CBTAU-47.1	tau 42-103	GLKESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAKSTPT AEDVTAPLVDEGAPGKQAAAPHTEIPEGT TA	325	++
	ptau 257-272 (pS262)	KSKIG (pS) TENLKHQPGG	332	-
CBTAU-47.2	tau 42-103	GLKESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAKSTPT AEDVTAPLVDEGAPGKQAAAPHTEIPEGT TA	325	++
	ptau 257-272 (pS262)	KSKIG (pS) TENLKHQPGG	332	-
CBTAU-49.1	tau 42-103	GLKESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAKSTPT AEDVTAPLVDEGAPGKQAAAPHTEIPEGT TA	325	++
	ptau 224-241 (pT231, pS235)	KKVAVVR (pT) PPK (pS) PSSAKS	333	-
AT8	ptau 194-212 (pS202, pT205)	RSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	315	++
	tau 194-212	RSGYSSPGSPGTPGSRRT	316	-

*Аминокислотный участок в изоформе tau441 человека.

Результаты показаны на фиг. 1a-t. Описанные в данном документе mAb к тау-белку можно подразделить на две основные группы: те, которые вступают в реакцию только с фосфорилированными пептидами (фосфозависимые mAb) и те, которые вступают в реакцию как с фосфорилированными, так и с нефосфорилированными пептидами (фосфонезависимые mAb). mAb к тау-белку CBTAU-7.1, CBTAU-8.1, CBTAU-18.1 и CBTAU-22.1 выделяли из индивидуумов без AD, используя подход, подробно описанный в примере 3. Эти mAb являются фосфозависимыми и, как показано посредством ELISA (фиг. 1), вступают в реакцию только с фосфорилированным пептидом, но не с нефосфорилированным пептидом, охватывающим этот участок, и не с нефосфорилированным вариантом этого пептида. mAb к тау-белку CBTAU-7.1 и CBTAU-8.1 вступают в специфичную реакцию с фосфорилированным пептидом, содержащим AT8-связывающий эпитоп. Этот пептид охватывает аминокислоты с 194 по 212 и содержит фосфорилированные остатки в положениях 202 и 205. CBTAU-18.1 вступает в реакцию с фосфорилированным пептидом, охватывающим аминокислоты 200-217 с фосфорилированным сериновым остатком в положении 210. Наконец, CBTAU-22.1 вступает в реакцию с пептидом, охватывающим аминокислоты 406-429, с двумя фосфорилированными сериновыми остатками в положениях 416 и 422.

Аналогично, CBTAU-20.1 был идентифицирован у индивидуума без AD и является преимущественно фосфозависимым, так как он вступает в реакцию с тремя различными фосфорилированными пептидами, охватывающими аминокислоты 59-77. Два из этих пептидов характеризуются двойным фосфорилированием, один в положениях 68 и 69 и второй в положениях 69 и 71. CBTAU-20.1 также вступает в реакцию с третьим пептидом, который характеризуется одинарным фосфорилированием в положении 71, что позволяет предположить, что фосфорилирование треонина 71 является достаточным и важным для реактивности CBTAU-20.1. CBTAU-20.1 проявляет слабую реактивность по отношению к нефосфорилированному пептиду, охватывающему участок 42-103.

Подобно вышеупомянутым mAb, CBTAU-16.1 и CBTAU-24.1 также выделяли из индивидуумов без AD; однако, оба mAb являются фосфонезависимыми и, как было видно из ELISA, вступают в реакцию как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным пептидом, охватывающим определенный участок. CBTAU-16.1 вступает в реакцию с аминокислотным участком 204-221, тогда как CBTAU-24.1 вступает в реакцию с тремя различными пептидами, охватывающими аминокислоты 221-245. Кроме того, два дополнительных mAb к тау-белку (CBTAU-27.1 и CBTAU-28.1) идентифицировали посредством скрининга, проводимого с образцами из доноров без AD с использованием нефосфорилированных пеп-

тидов длиной 60-70 аминокислот, соответствующих аминокислотным участкам 42-103 и 299-369 соответственно; следовательно, оба mAb являются специфичными к нефосфорилированному тау-белку.

В заключение, mAb CBTAU 41.1, 41.2, 42.1, 43.1, 44.1, 45.1, 46.1, 47.1, 47.2 и 49.1 идентифицировали посредством небольшого исследования, в котором скринингу подвергали 25 молодых индивидуумов без AD (18-27 лет), 25 индивидуумов без AD (55+ лет), и 25 индивидуумов с AD (55+ лет). Набор пептидов, которые использовали для этого исследования, включал 8 фосфорилированных пептидов (в том числе родственный пептид для CBTAU-22.1) и 2 нефосфорилированных пептида (родственные пептиды для CBTAU-27.1 и CBTAU-28.1). mAb CBTAU 41.1, 41.2 и 42.1 выделяли из доноров с AD и подвергали реакции с родственным пептидом для CBTAU-22.1. Аналогично CBTAU-22.1, эти mAb являются фосфозависимыми, как показано на фиг. 1j-l. У индивидуумов без AD (55+ лет) идентифицировали два дополнительных mAb (CBTAU-44.1 и CBTAU-45.1) с реактивностью по отношению к родственному пептиду для CBTAU-22.1. Как и ожидалось, эти два антитела также являлись фосфозависимыми (фиг. 1n-o). CBTAU-43.1 также идентифицировали посредством скрининга, проводимого с индивидуумами без AD (55+ лет); однако, mAb было выделено с помощью родственного пептида для CBTAU-27.1 и является специфичным к нефосфорилированному тау-белку (фиг. 1m). В заключение, CBTAU-46.1, 47.1, 47.2 и 49.1 были выделены из индивидуумов без AD (18-27 лет) с реактивностью по отношению к пептиду для CBTAU-28.1 и, аналогично CBTAU-28.1, являются специфичными к нефосфорилированному тау-белку (фиг. 1p-s).

Пример 7. Реактивность по отношению к парным спиральным филаментам и рекомбинантному тау-белку, определяемая посредством ELISA.

Для того чтобы дополнительно охарактеризовать специфичность некоторых химерных антител, тестировали их реактивность по отношению к рекомбинантному тау-белку, обогащенным и очищенным иммуноаффинным способом парным спиральным филаментам посредством ELISA.

PHF-тау-белок очищали иммуноаффинным способом в соответствии с протоколом Greenberg и Davies. Вкратце, кортикальные ткани, соответствующие индивидуумам с болезнью Альцгеймера, гомогенизировали в 10 объемах холодного буфера (10 mM Tris, pH 7,4, 1 mM EGTA, 0,8M NaCl и 10% сахарозы) и центрифугировали при $27200 \times g$ в течение 20 мин при 4°C. К надосадочной жидкости добавляли N-лаурилсаркозин и 2-меркаптоэтанол для достижения конечной концентрации 1% (вес./об.) и 1% (об./об.) соответственно. Смесь инкубировали при 37°C в течение 2-2,5 ч с постоянным покачиванием, после чего следовало центрифугирование при $108000 \times g$ в течение 30 мин при комнатной температуре. Осадок, содержащий PHF-тау-белок, промывали 3 раза в PBS и растворяли в PBS без ингибиторов белков и дополнительно центрифугировали при $12000 \times g$ в течение 5 мин. Выделенную надосадочную жидкость, содержащую обогащенный PHF-тау-белок (ePHF-тау-белок), подвергали иммуноаффинной очистке на колонке для аффинной хроматографии с hTauO и элюировали с помощью 3 или 4M KSCN в течение ночи при 4°C, после чего следовал диализ против 1 л PBS при 4°C с 3 заменами буфера. hTau10 является антителом, образованным в собственной лаборатории при иммунизации рекомбинантным тау-белком. Оно связывается как с рекомбинантным, так и с PHF-тау-белком по аминоконцевому эпитопу. Очищенный иммуноаффинным способом PHF-тау-белок (iPHF-тау-белок) концентрировали с помощью устройства для центрифужной фильтрации от Sartorius.

Для ELISA 96-луночные планшеты для связывания с половинным объемом лунок (Costar) покрывали 50 мкл антигена в TBS (2 мкг/мл рекомбинантного тау-белка, 2 мкг/мл бычьего актина и антитела козы к F(ab)₂-фрагменту человека, очищенного аффинной хроматографией, 1 мкг/мл аффинно очищенных парных спиральных филаментов и 1 мкг/мл моноклонального антитела к тау-белку HT7 (Thermo Scientific, MN1000)). На следующий день планшеты промывали в TBS-T и затем блокировали 150 мкл TBS с 2,5% BSA в течение 2 ч при RT. После блокирования ePHF-тау-белок захватывали в течение 2 ч при RT на планшете, покрытом антителом к тау-белку. Очищенные IgG к тау-белку разводили до 10 мкг/мл в TBS с 0,25% BSA, и IgG титровали в 5-кратных разведениях при RT в течение 2 ч AT8 (10 мкг/мл) использовали в качестве положительного контроля для iPHF-тау-белка и захваченного ePHF-тау-белка. Планшеты промывали 5 раз в TBS-T и добавляли вторичные антитела, разведенные в TBS с 0,25% BSA, и инкубировали при RT в течение 1 ч. Антитело козы к F(ab')₂ IgG человека (Jackson Labs) использовали в разведении 1:2000, и антитело козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированное с HRP (Jackson Labs), использовали в разведении 1:4000 (используемом для антитела к актину в качестве контроля). После инкубирования планшеты промывали 4 раза в TBS-T и проявляли субстратом пероксидазы для микролунок SureBlue Reserve TMB (KPL) в течение примерно 2 мин. Реакцию немедленно останавливали посредством добавления останавливающего раствора TMB (KPL), и измеряли поглощение при 450 нм, используя планшет-ридер для ELISA.

Результаты показаны на фиг. 2a-j. Как и ожидалось, посредством ELISA было выявлено, что фосфозависимые mAb CBTAU-7.1, CBTAU-8.1 и CBTAU-18.1 не вступают в реакцию с рекомбинантным тау-белком (фиг. 2a,b,d). CBTAU-20.1 проявляет незначительную реактивность по отношению к рекомбинантному тау-белку, что согласуется с его слабой реактивностью по отношению к нефосфорилированному пептиду, охватывающему участок 42-103. Примечательно, что эти фосфозависимые mAb не проявляют какую-либо реактивность по отношению к парным спиральным филаментам (т.е. ePHF-тау-белку и

iPHF-тау-белку), за исключением СВТАУ-7.1, которое проявляет незначительную реактивность по отношению к ePHF-тау-белку при более высоких концентрациях антитела. Наконец, фосфозависимое СВТАУ-22.1 не проявляет реактивность по отношению к рекомбинантному тау-белку, но вступает в реакцию как с iPHF-тау-белком, так и с ePHF-тау-белком (фиг. 2f).

Фосфонеинзависимые mAb к тау-белку СВТАУ-16.1 и СВТАУ-24.1 вступают в реакцию как с рекомбинантным тау-белком, так и с обоими форматами парных спиральных филаментов (т.е. iPHF-тау-белком и ePHF-тау-белком; фиг. 2с и g). СВТАУ-28.1 проявляет сильное связывание с рекомбинантным тау-белком при слабой иммунореактивности к обоим форматам PHF-тау-белка (фиг. 2i). В заключение, СВТАУ-27.1 проявляет слабую иммунореактивность по отношению как к рекомбинантному тау-белку, так и к PHF-тау-белку (фиг. 1h).

Пример 8. Реактивность по отношению к парным спиральным филаментам и рекомбинантному тау-белку, определяемая посредством вестерн-блот-анализа.

Для расширения наблюдений связывания гTau и PHF в ELISA и исследования того, играет ли вторичная структура роль в реактивности, рекомбинантный тау-белок, обогащенные и очищенные иммуноаффинным способом парные спиральные филаменты тестировали посредством вестерн-блот-анализа. Примерно 0,5 мкг iPHF, ePHF и 1 мкг гTau в 1X конечной концентрации буфера для образца NuPAGE LDS (конечная концентрация 0,5% LDS) (Novex, NP0007) нагревали при 70°C в течение 10 мин. Образцы загружали в 26-луночный 4-12% гель Bis-Tris Novex NuPAGE (Invitrogen) с подвижным буфером MOPS SDS (Novagen, NP0001) и затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану блокировали в течение ночи в 1X Tris-буферизированном физиологическом растворе (TBS) с 0,05% Tween20 и 4% обезжиренного сухого молока. mAb СВТАУ использовали в качестве первичных при 25 мкг/мл в 1X TBS с 0,05% Tween20 и 4% обезжиренного сухого молока и инкубировали в течение 2 ч. при комнатной температуре. Затем мембрану промывали 3 раза, каждый раз в течение 5 мин, в 1X TBS с 0,05% Tween20. Очищенное аффинной хроматографией конъюгированное с пероксидазой антитело козы к IgG человека, специфичное к Fcγ-фрагменту (Jackson ImmunoResearch), затем использовали в качестве вторичного в разведении 1:2000 в 1X TBS с 0,05% Tween20 и 4% обезжиренного сухого молока и инкубировали в течение 45 мин при RT. Мембрану промывали 3 раза, каждый раз в течение 5 мин, и проявляли с использованием набора Supersignal West Pico (Pierce).

Результаты вестерн-блот-анализа показаны на фиг. 3. На фигуре показана реактивность трех контрольных антител AT8, AT100 и HT7 (соответственно двух специфичных к фосфо-тау-белку и специфичного к общему тау-белку). Как для AT8, так и для AT100 показана характеристика PHF-тау-белка в виде трех полос, которые соответствуют приблизительно 68, 64 и 60 кДа. В отличие от результатов ELISA, посредством вестерн-блоттинга было выявлено, что фосфозависимые mAb СВТАУ-7.1 и СВТАУ-18.1 вступают в реакцию как с iPHF-тау-белком, так и с ePHF-тау-белком, что позволяет предположить, что эпитопы для этих моноклональных антител недоступны, когда тау-белок принимает конформации более высокого порядка, присутствующие в PHF-тау-белке. Однако эти эпитопы становятся доступными в сильных денатурирующих условиях SDS-PAGE. СВТАУ-27.1 проявляет связывание с рекомбинантным тау-белком и PHF, выявляемое в ходе вестерн-блоттинга, но слабую реактивность по отношению к ним, определяемую в ходе ELISA, что позволяет предположить, что эпитоп для этого антитела доступен только в сильных денатурирующих условиях. СВТАУ-28.1 вступает в интенсивную реакцию с рекомбинантным тау-белком, выявляемую в ходе как вестерн-блоттинга, так и ELISA, и также проявляет реактивность по отношению к PHF-тау-белку, определяемую в ходе обоих анализов. СВТАУ-28.1 вступает в реакцию с участком E1/E2 тау-белка (аминокислоты 42-103), который присутствует не во всех изоформах тау-белка; таким образом, с помощью СВТАУ-28.1 обнаруживают только полосы 68 и 64 кДа PHF-тау-белка. В заключение, СВТАУ-22.1 и СВТАУ-24.1 демонстрируют аналогичные результаты в анализе ELISA, вступая в реакцию соответственно с PHF-тау-белком, но не с рекомбинантным тау-белком либо как с PHF-тау-белком, так и с рекомбинантным тау-белком.

Пример 9. Реактивность по отношению к пептидным фрагментам тау-белка, определяемая в ходе ELISA.

Для определения характеристик специфичности выделенных антител проводили тестирования их реактивности по отношению к фосфорилированным и нефосфорилированным тау-пептидам (табл. 11-21, фиг. 4a-g) посредством ELISA. Биотинилированные тау-пептиды синтезировали в промышленных масштабах и растворяли в воде при 1 нг/мл и замораживали при -80°C. Вкратце, 96-луночные планшеты для связывания стрептавидина (Thermo-Fisher) покрывали 2 мкг/мл тау-пептидов, разведенных в TBS, и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующий день планшеты промывали в TBS-T и затем блокировали 2,5% BSA в TBS в течение 2 ч при RT. После блокирования очищенные IgG к тау-белку разводили до 2 мкг/мл (или до 5 мкг/мл и титровали в 5-кратных разведениях для более тонкого картирования СВТАУ-27.1, 28.1, 43.1, 46.1, 47.1, 47.2 и 49.1, используя последовательности пептидов из табл. 15-20) в TBS с 0,25% BSA и инкубировали при RT в течение 2 ч. Химеризированный человеческими участками вариант IgG AT8 (при 2 мкг/мл), описанный в примере 11, использовали в качестве положительного контроля в каждом эксперименте по картированию. Планшеты промывали 5 раз в TBS-T, после чего добавляли вторичное антитело [антитело козы к F(ab')₂ IgG человека (Jackson Labs) в разведении 1:2000], раз-

веденное в TBS с 0,25% BSA, и инкубировали при RT в течение 1 ч. После инкубирования планшеты промывали 4 раза в TBS-T и проявляли субстратом пероксидазы для микролунок SureBlue Reserve TMB (KPL) в течение примерно 90 с. Реакцию немедленно останавливали посредством добавления останавливающего раствора TMB (KPL), и измеряли поглощение при 450 нм, используя планшет-ридер для ELISA. Каждый эксперимент проводили в трех повторностях в три разных дня. Реактивность считали положительной, если значения OD были равными или превышающими 0,4 в анализе ELISA. Для определения реактивности каждого mAb по отношению к фосфорилированным и нефосфорилированным тау-пептидам определяли реактивность антител при 2 мкг/мл посредством ELISA и оценивали как отсутствие связывания (-), слабую (-/+), среднюю (+) или сильную (++) . (-) для среднего значения двух показателей O.D. при 450 нм < 0,3; (-/+) для > 0,5 и < 1,0; (+) для > 1,0 и < 1,5; (++) для > 1,5. Для более тонкого картирования CBTAU-27.1, 28.1, 43.1, 46.1, 47.1, 47.2 и 49.1 (подробно описанного в табл. 15-20) определяли реактивность антител при 1 мкг/мл посредством ELISA и оценивали как отсутствие связывания (-), слабую (-/+), среднюю (+) или сильную (++) . (-) для среднего значения трех показателей O.D. при 450 нм < 0,3; (-/+) для > 0,5 и < 1,0; (+) для > 1,0 и < 1,5; (++) для > 1,5.

Таблица 11. CBTAU-7.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.	Последовательность пептида (pX) обозначает фосфорилированную аминокислоту	Результаты
tau 186-253	321	GEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPK KVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDPL	-
ptau 187-212	334	EPPKSGDRSG (pY) SSPGSPG (pT) PGSRSRRT	-/+
ptau 188-205	335	PPKSGDRSGY (pS) SPGSPGT	-
ptau 188-206	336	PPKSGDRSGY (pS) (pS) PGSPGTP	-
ptau 188-209	337	PPKSGDRSGY (pS) SPG (pS) PGTPGSR	++
ptau 188-212	338	PPKSGDRSGY (pS) SPGSPG (pT) PGSRSRRT	-/+
ptau 189-206	339	PKSGDRSGYS (pS) PGSPGTP	-
ptau 189-209	340	PKSGDRSGYS (pS) PG (pS) PGTPGSR	-
ptau 189-212	341	PKSGDRSGYS (pS) PGSPG (pT) PGSRSRRT	+
tau 190-209	342	KSGDRSGYSSPGSPGTPGSR	-
ptau 192-209	343	GDRSGYSSPG (pS) PGTPGSR	-
ptau 192-212	344	GDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRRT	+
ptau 192-215	345	GDRSGYSSPG (pS) PGTPG (pS) RSRTPSL	-
ptau 192-217	346	GDRSGYSSPG (pS) PGTPGSR (pS) RTPSLPT	-
ptau 194-212	315	RSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRRT	+
tau 194-212	316	RSGYSSPGSPGTPGSRSRRT	-

Таблица 12. CBTAU-18.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.	Последовательность пептида (pX) обозначает фосфорилированную аминокислоту	Результаты
ptau 186-253	321	GEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPK KVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDPL	-
ptau 192-217	346	GDRSGYSSPG (pS) PGTPGSR (pS) RTPSLPT	++
ptau 194-212	315	RSGYSSPG (pS) PG (pT) GSRSRRT	-
tau 194-212*	316	RSGYSSPGSPGTPGSRSRRT	-
ptau 195-212	347	SGYSSPGSPG (pT) PGSRSRRT	-
ptau 195-215	348	SGYSSPGSPG (pT) PG (pS) RSRTPSL	-
ptau 195-217	349	SGYSSPGSPG (pT) PGSR (pS) RTPSLPT	++
ptau 195-219	350	SGYSSPGSPG (pT) PGSRSR (pT) PSLPTPP	-
tau 195-214	351	SGYSSPGSPGTPGSRSRTPS	-
ptau 198-215	352	SSPGSPGTPG (pS) RSRTPSL	-
ptau 198-217	353	SSPGSPGTPG (pS) R (pS) RTPSLPT	++

ptau 198-219	354	SSPGSPGTPG (pS) RSR (pT) PSLPTPP	-/+
ptau 198-221	355	SSPGSPGTPG (pS) RSRT (pS) LPTPPTR	-
tau 198-217	356	SSPGSPGTPGSRSRTPSLPT	-
ptau 200-217	319	PGSPGTPGSR (pS) RTPSLPT	+
tau 200-217	320	PGSPGTPGSRSRTPSLPT	-
ptau 200-219	357	PGSPGTPGSR (pS) R (pT) PSLPTPP	-/+
ptau 200-221	358	PGSPGTPGSR (pS) RTP (pS) LPTPPTR	-
ptau 200-224	359	PGSPGTPGSR (pS) RTPSLP (pT) PPTREPK	-

Таблица 13. CBTAU-22.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.	Последовательность пептида (pX) обозначает фосфорилированную аминокислоту	Результаты
ptau 404-421	360	SPRHLSNVSS (pT) GSIDMVD	-
ptau 404-429	361	SPRHLSNVSS (pT) GSIDMVD (pS) PQLATLA	++
tau 405-423	362	PRHLSNVSSGSGSIDMVDSP	-
ptau 406-423	363	RHLSNVSSG (pS) IDMDSP	-
ptau 406-429	326	RHLSNVSSG (pS) IDMD (pS) PQLATLA	++
tau 409-428	364	SNVSSGSGSIDMVDSPQLATL	-
ptau 412-429	365	SSTGSIDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 412-434	366	SSTGSIDMVD (pS) PQLA (pT) LADEVSA	++

Таблица 14. CBTAU-24.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.	Последовательность пептида (pX) обозначает фосфорилированную аминокислоту	Результаты
tau 221-253	367	GEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPK KVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDL	++
ptau 221-238	368	REPCKVAVVR (pT) PPKSPSS	-
ptau 221-242	369	REPCKVAVVR (pT) PPK (pS) PSSAKSR	-
ptau 221-244	370	REPCKVAVVR (pT) PPKSP (pS) SAKSRLQ	-
ptau 221-245	328	REPCKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau 225-242	371	KVAVVRTPPK (pS) PSSAKSR	-
ptau 225-244	372	KVAVVRTPPK (pS) P (pS) SAKSRLQ	-/+
ptau 225-245	330	KVAVVRTPPK (pS) PS (pS) AKSRLQT	++
ptau 227-244	373	AVVRTPPKSP (pS) SAKSRLQ	++
ptau 227-245	374	AVVRTPPKSP (pS) (pS) AKSRLQT	++
ptau 228-245	329	VVRTPPKSPS (pS) AKSRLQT	++

Таблица 15. CBTAU-27.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.	Последовательность пептида (pX) обозначает фосфорилированную аминокислоту	Результаты
		Кластер 1	
tau 299-369	331	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSCGSLGNIHHKPGGGQV EVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNK	++
		Cluster 2	
ptau 404-421 p414	360	SPRHLSNVSS (pT) GSIDMVD	-
ptau 404-429 p414, 422	361	SPRHLSNVSS (pT) GSIDMVD (pS) PQLATLA	-/+
ptau 406-423 p416	363	RHLSNVSSSTG (pS) IDMVDSP	-
ptau 406-429 p416, 422	326	RHLSNVSSSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	-/+
ptau 412-429 p422	365	SSTGSIDMVD (pS) PQLATLA	-/+
ptau 412-434 p422, 427	366	SSTGSIDMVD (pS) PQLA (pT) LADEVSA	-/+
tau 299-318	375	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKV	+
tau 309-328	376	VYKPVDSLKVTSCGSLGNI	-/+
tau 319-338	377	TSKCGSLGNIHHKPGGGQVE	-
tau 329-348	378	HHKPGGGQVEVKSEKLDKFD	-
tau 339-358	379	VKSEKLDKDRVQSKIGSLD	-
tau 349-369	380	RVQSKIGSLDNITHVPGGGNK	-

Таблица 16. CBTAU-28.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.	Последовательность пептида	Результаты
tau 42-103	325	GLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLV DEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTA	++
tau 42-61	381	GLKESPLQTPTEDGSEEPGS	-
tau 52-71	382	TEDGSEEPGSETSDAKSTPT	++
ptau 58-75	383	EPGSETSDAK (pS) TPTAEDV	-
tau 62-81	384	ETSDAKSTPTAEDVTAPLVD	-
tau 72-91	385	AEDVTAPLVDEGAPGKQAAA	-
tau 82-103	386	EGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTA	-

Таблица 17. CBTAU-43.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.	Последовательность пептида	Результаты
tau 299-369	331	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSCGSLGNIHHKPGGGQV EVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNK	++
tau 299-318	375	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKV	++
tau 309-328	376	VYKPVDSLKVTSCGSLGNI	++
tau 319-338	377	TSKCGSLGNIHHKPGGGQVE	-
tau 329-348	378	HHKPGGGQVEVKSEKLDKFD	-
tau 339-358	379	VKSEKLDKDRVQSKIGSLD	-
tau 349-369	380	RVQSKIGSLDNITHVPGGGNK	-

Таблица 18. CBTAU-46.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.	Последовательность пептида	Результаты
tau 42-103	325	GLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLV DEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTA	++
tau 42-61	381	GLKESPLQTPTEDGSEEPGS	-
tau 52-71	382	TEDGSEEPGSETSDAKSTPT	-
tau 62-81	384	ETSDAKSTPTAEDVTAPLVD	-
tau 72-91	385	AEDVTAPLVDEGAPGKQAAA	-
tau 82-103	386	EGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTA	++

Таблица 19. CBTAU-47.1 и CBTAU-47.2: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.	Последовательность пептида	Результаты
tau 42-103	325	GLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVD EGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTA	++
tau 42-61	381	GLKESPLQTPTEDGSEEPGS	-
tau 52-71	382	TEDGSEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 62-81	384	ETSDAKSTPTAEDVTAPLVD	-
tau 72-91	385	AEDVTAPLVDEGAPGKQAAA	-
tau 82-103	386	EGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTA	-

Таблица 20. CBTAU-49.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.	Последовательность пептида	Результаты
tau 42-103	325	GLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVD EGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTA	++
tau 42-61	381	GLKESPLQTPTEDGSEEPGS	-
tau 52-71	382	TEDGSEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 62-81	384	ETSDAKSTPTAEDVTAPLVD	-
tau 72-91	385	AEDVTAPLVDEGAPGKQAAA	-
tau 82-103	386	EGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTA	-

Таблица 21. AT8: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.	Последовательность пептида (pX) обозначает фосфорилированную аминокислоту	Результат
ptau 189-212	341	PKSGDRSGYS (pS) PGSPG (pT) PGSRSRT	-
tau 192-211	387	GDRSGYSSPGSPGTPGSR	-
ptau 192-209	343	GDRSGYSSPG (pS) PGTPGSR	-
ptau 192-212	344	GDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++
ptau 192-215	345	GDRSGYSSPG (pS) PGTPG (pS) RSRTPSL	-
ptau 192-217	346	GDRSGYSSPG (pS) PGTPGSR (pS) RTPSLPT	--
ptau 194-212	315	RSYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++
tau 194-212*	316	RSYSSPGSPGTPGSR	-
ptau 195-212	347	SGYSSPGSPG (pT) PGSRSRT	-

Несмотря на то что CBTAU-7.1 выделяли с использованием пептида, содержащего эпитоп для AT8 (табл. 21; 192-212; pS202, pT205), фосфорилированные остатки, способствующие связыванию CBTAU-7.1, оказались беспорядочно расположенными, включающими положения S202+T205, но также и комбинации S198+S202, S198+T205, S199+T205 и, возможно, Y197+T205. Нефосфорилированные пептиды не проявляли реактивность по отношению к CBTAU-7.1. Для CBTAU-18.1 установили, что минимальный эпитоп состоит из аминокислот 198-217 и зависит от pS210, но не в тех случаях, когда T212, S214 или

T217 также являлись фосфорилированными. Установили, что реактивность СВТАУ-22.1 зависит от pS422, при этом для антитела СВТАУ-24.1 было выявлено сильное связывание с его соответствующим нефосфорилированным пептидом, и на него, таким образом, не влияет фосфорилирование.

СВТАУ-27.1 и СВТАУ-43.1 выделяли с использованием нефосфорилированного пептида, охватывающего аминокислоты 299-369. Примечательно, что для перекрывающихся пептидов в пределах этого участка были выявлены аналогичные требования к связыванию обоих mAb (т.е. СВТАУ-27.1 и СВТАУ-43.1 вступали в реакцию с пептидами, охватывающими соответственно аминокислоты 299-318 и 309-328), что позволяет предположить, что эпитоп для обоих mAb находится в пределах участка 299-328 в tau441 (фиг. 4а и с).

СВТАУ-28.1, 46.1, 47.1, 47.2 и 49.1 выделяли из образцов донора-человека с использованием пептида, охватывающего участок 42-103 в tau441. Тестирования реактивности каждого mAb в отношении меньшего набора перекрывающихся пептидов показали связывание для СВТАУ-47.1, 47.2 и 49.1, аналогичное СВТАУ-28.1 (т.е. реактивность по отношению к пептиду, охватывающему участок 52-71), что позволяет предположить сравнимые требования к связыванию; однако, СВТАУ-46.1 связывается с участком, расположенным в С-концевом направлении относительно участка для вышеупомянутых mAb (т.е. 82-103; фиг. 4b и d-g).

Пример 10. Аланиновое сканирование пептидных эпитопов.

Для определения дополнительных характеристик специфичности и вклада аминокислот в связывание каждого выделенного mAb проводили тестирования их реактивности по отношению к тау-пептидам посредством ELISA при замещении аланином в каждом положении. Все протоколы экспериментов были идентичны примеру 9. Реактивность антител при 1 мкг/мл определяли посредством ELISA и оценивали как отсутствие связывания (-), слабую (-/+), среднюю (+) или сильную (++). (-) для среднего значения двух показателей O.D. при 450 нм < 0,3; (-/+) для > 0,5 и < 1,0; (+) для > 1,0 и < 1,5; (++) для > 1,5. Результаты для каждого антитела показаны в табл. 22-29.

Таблица 22. Результаты аланинового сканирования для СВТАУ-7.1 и СВТАУ-8.1

Участок (Tau441)	SEQ ID NO	Пептидная последовательность (pX) обозначает фосфорилированную аминокислоту	Результаты 7.1	Результаты 8.1
ptau 187-212	334	EPPKSGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A187)	388	APPKSGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	+	++
ptau 187-212 (A188)	389	EAPKSGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	+	++
ptau 187-212 (A189)	390	EPAKSGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	+	++

ptau 187-212 (A190)	391	EPPASGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A191)	392	EPPKAGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A192)	393	EPPKSADRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A193)	394	EPPKSGARSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A194)	395	EPPKSGDASGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A195)	396	EPPKSGDRAGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A196)	397	EPPKSGDRSAYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A197)	398	EPPKSGDRSGASSPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A198)	399	EPPKSGDRSGYASPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A199)	400	EPPKSGDRSGYSAPG (pS) PG (pT) PGSRSRT	+	++
ptau 187-212 (A200)	401	EPPKSGDRSGYSSAG (pS) PG (pT) PGSRSRT	+	++
ptau 187-212 (A201)	402	EPPKSGDRSGYSSPA (pS) PG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A202)	403	EPPKSGDRSGYSSPGAPG (pT) PGSRSRT	+	++
ptau 187-212 (A203)	404	EPPKSGDRSGYSSPG (pS) AG (pT) PGSRSRT	++	++
ptau 187-212 (A204)	405	EPPKSGDRSGYSSPG (pS) PA (pT) PGSRSRT	-/+	+
ptau 187-212 (A205)	406	EPPKSGDRSGYSSPG (pS) PGAPGSRRT	-/+	-/+
ptau 187-212 (A206)	407	EPPKSGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) AGSRRT	-/+	-
ptau 187-212 (A207)	408	EPPKSGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PASRRT	++	-/+
ptau 187-212 (A208)	409	EPPKSGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGARSRT	++	++
ptau 187-212 (A209)	410	EPPKSGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSASRT	++	-
ptau 187-212 (A210)	411	EPPKSGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRART	++	++
ptau 187-212 (A211)	412	EPPKSGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSAT	++	++
ptau 187-212 (A212)	413	EPPKSGDRSGYSSPG (pS) PG (pT) PGSRSRA	++	++

Таблица 23. Результаты аланинового сканирования для СВТАУ-22.1

Участок (Tau441)	SEQ ID NO	Последовательность пептида (pX) обозначает фосфорилированную аминокислоту	Результаты
ptau 406-429	326	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A406)	414	AHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A407)	415	RALSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A408)	416	RHASNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A409)	417	RHLANVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A410)	418	RHLSAVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A411)	419	RHLSNASSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A412)	420	RHLSNVASTG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A413)	421	RHLSNVSATG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A414)	422	RHLSNVSSAG (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A415)	423	RHLSNVSSTA (pS) IDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A416)	424	RHLSNVSTGAIDMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A417)	425	RHLSNVSTG (pS) ADMVD (pS) PQLATLA	++

ptau 406-429 (A418)	426	RHLSNVSTG (pS) IAMVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A419)	427	RHLSNVSTG (pS) IDAVD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A420)	428	RHLSNVSTG (pS) IDMAD (pS) PQLATLA	++
ptau 406-429 (A421)	429	RHLSNVSTG (pS) IDMVA (pS) PQLATLA	-/+
ptau 406-429 (A422)	430	RHLSNVSTG (pS) IDMVDAPQLATLA	-
ptau 406-429 (A423)	431	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) AQLATLA	++
ptau 406-429 (A424)	432	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PALATLA	++
ptau 406-429 (A425)	433	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQAATLA	++
ptau 406-429 (A427)	434	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLAALA	++
ptau 406-429 (A428)	435	RHLSNVSTG (pS) IDMVD (pS) PQLATAA	++

Таблица 24. Результаты аланинового сканирования для СВТАУ-24.1

Участок (Tau441)	SEQ NO	ID	Последовательность пептида (pX) обозначает фосфорилированную аминокислоту	Результаты
ptau 221-245	328		REPKKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau 221-245 (A222)	436		RAPKKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau 221-245 (A223)	437		REAKKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau 221-245 (A224)	438		REPAKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau 221-245 (A225)	439		REPKAVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau 221-245 (A226)	440		REPKKAIVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau 221-245 (A228)	441		REPKKVAIVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQT	++

ptau (A229)	221-245	442	REPKKVAVAR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau (A230)	221-245	443	REPKKVAVVA (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau (A231)	221-245	444	REPKKVAVVRAPPKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau (A232)	221-245	445	REPKKVAVVR (pT) APKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau (A233)	221-245	446	REPKKVAVVR (pT) PAKSPS (pS) AKSRLQT	++
ptau (A234)	221-245	447	REPKKVAVVR (pT) PPASPS (pS) AKSRLQT	++
ptau (A235)	221-245	448	REPKKVAVVR (pT) PPKAPS (pS) AKSRLQT	++
ptau (A236)	221-245	449	REPKKVAVVR (pT) PPKSAS (pS) AKSRLQT	-
ptau (A237)	221-245	450	REPKKVAVVR (pT) PPKSPA (pS) AKSRLQT	++
ptau (A238)	221-245	451	REPKKVAVVR (pT) PPKSPSAAKSRLQT	++
ptau (A240)	221-245	452	REPKKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AASRLQT	++
ptau (A241)	221-245	453	REPKKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKARLQT	++
ptau (A242)	221-245	454	REPKKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSALQT	++
ptau (A243)	221-245	455	REPKKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRAQT	++
ptau (A244)	221-245	456	REPKKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLAT	++
ptau (A245)	221-245	457	REPKKVAVVR (pT) PPKSPS (pS) AKSRLQA	++

Таблица 25. Результаты аланинового сканирования для СВТАU-27.1

Участок (Tau441)	SEQ ID NO:	Последовательность пептида	Результаты
tau 299-323	458	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A299)	459	AVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++

tau 299-323 (A300)	460	HAPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A301)	461	HVAGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A302)	462	HVPAGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A303)	463	HVPGAGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A304)	464	HVPGGASVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A305)	465	HVPGGGAVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A306)	466	HVPGGGSQAIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A307)	467	HVPGGGSVAIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A308)	468	HVPGGGSVQAVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A309)	469	HVPGGGSVQIAYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A310)	470	HVPGGGSVQIVAKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A311)	471	HVPGGGSVQIVYAPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A312)	472	HVPGGGSVQIVYKAVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A313)	473	HVPGGGSVQIVYKPADLSKVTSKCG	++
tau 299-323 (A314)	474	HVPGGGSVQIVYKPVALSKVTSKCG	-/+
tau 299-323 (A315)	475	HVPGGGSVQIVYKPVDAKSVTSKCG	-
tau 299-323 (A316)	476	HVPGGGSVQIVYKPVDLAKSVTSKCG	++
tau 299-323 (A317)	477	HVPGGGSVQIVYKPVDSLAVTSKCG	-
tau 299-323 (A318)	478	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKATSKCG	++
tau 299-323 (A319)	479	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVASKCG	++
tau 299-323 (A320)	480	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTAACKG	++
tau 299-323 (A321)	481	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSACG	++
tau 299-323 (A322)	482	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKAG	++
tau 299-323 (A323)	483	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCA	++

Таблица 26. Результаты аланинового сканирования для СВТАУ-28.1

Участок (Tau441)	SEQ ID NO	Последовательность пептида	Результаты
tau 52-71	382	TEDGSEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A52)	484	AEDGSEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A53)	485	TADGSEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A54)	486	TEAGSEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A55)	487	TEDASEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A56)	488	TEDGAEEPgSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A57)	489	TEDGSAEPGSETSDAKSTPT	++

tau 52-71 (A58)	490	TEDGSEAPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A59)	491	TEDGSEEAGSETSDAKSTPT	-/+
tau 52-71 (A60)	492	TEDGSEEPASETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A61)	493	TEDGSEEPGAETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A62)	494	TEDGSEEPGSATSDAKSTPT	-
tau 52-71 (A63)	495	TEDGSEEPGSEASDAKSTPT	-/+
tau 52-71 (A64)	496	TEDGSEEPGSETADAKSTPT	++
tau 52-71 (A65)	497	TEDGSEEPGSETSAKSTPT	-
tau 52-71 (A67)	498	TEDGSEEPGSETSDAASTPT	-
tau 52-71 (A68)	499	TEDGSEEPGSETSDAKATPT	++
tau 52-71 (A69)	500	TEDGSEEPGSETSDAKSAPT	++
tau 52-71 (A70)	501	TEDGSEEPGSETSDAKSTAT	++
tau 52-71 (A71)	502	TEDGSEEPGSETSDAKSTPA	++

Таблица 27. Результаты аланинового сканирования для CBTAU-43.1

Участок (Tau441)	SEQ ID NO:	Последовательность пептида	Результаты
tau 299-323	458	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A299)	459	AVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A300)	460	HAPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A301)	461	HVAGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A302)	462	HVPAGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A303)	463	HVPGAGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A304)	464	HVPGGASVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A305)	465	HVPGGGAVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A306)	466	HVPGGGSAQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A307)	467	HVPGGGSVAIVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A308)	468	HVPGGGSVQAVYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A309)	469	HVPGGGSVQIAYKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A310)	470	HVPGGGSVQIVAKPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A311)	471	HVPGGGSVQIVYAPVDSLKVTSKCG	++
tau 299-323 (A312)	472	HVPGGGSVQIVYKAVDSLKVTSKCG	-/+
tau 299-323 (A313)	473	HVPGGGSVQIVYKPADLSKVTSKCG	++
tau 299-323 (A314)	474	HVPGGGSVQIVYKPVALSKVTSKCG	++
tau 299-323 (A315)	475	HVPGGGSVQIVYKPVDAKSKVTSKCG	-
tau 299-323 (A316)	476	HVPGGGSVQIVYKPVDLAKVTSKCG	++
tau 299-323 (A317)	477	HVPGGGSVQIVYKPVDSLAVTSKCG	-
tau 299-323 (A318)	478	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKATSKCG	++
tau 299-323 (A319)	479	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVASKCG	++
tau 299-323 (A320)	480	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTAACKG	++
tau 299-323 (A321)	481	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSACKG	++
tau 299-323 (A322)	482	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKAG	++
tau 299-323 (A323)	483	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCA	++

Таблица 28. Результаты аланинового сканирования для СВТАU-47.1 и 47.2

Участок (Tau441)	SEQ ID NO	Последовательность пептида	Результаты СВТАU-47.1	Результаты СВТАU-47.2
tau 52-71	382	TEDGSEEPGSETSDAKSTPT	++	++
tau 52-71 (A52)	484	AEDGSEEPGSETSDAKSTPT	++	++
tau 52-71 (A53)	485	TADGSEEPGSETSDAKSTPT	++	++
tau 52-71 (A54)	486	TEAGSEEPGSETSDAKSTPT	++	++
tau 52-71 (A55)	487	TEDASEEPGSETSDAKSTPT	++	++
tau 52-71 (A56)	488	TEDGAEEPGSETSDAKSTPT	++	++
tau 52-71 (A57)	489	TEDGSAEPGSETSDAKSTPT	++	++
tau 52-71 (A58)	490	TEDGSEAPGSETSDAKSTPT	++	++
tau 52-71 (A59)	491	TEDGSEEAGSETSDAKSTPT	-	-
tau 52-71 (A60)	492	TEDGSEEPASETSDAKSTPT	++	++
tau 52-71 (A61)	493	TEDGSEEPGAETSDAKSTPT	-/+	++
tau 52-71 (A62)	494	TEDGSEEPGSATSDAKSTPT	-	-
tau 52-71 (A63)	495	TEDGSEEPGSEASDAKSTPT	-	-
tau 52-71 (A64)	496	TEDGSEEPGSETADAKSTPT	++	++
tau 52-71	497	TEDGSEEPGSETSAKSTPT	-	-
(A65)				
tau 52-71 (A67)	498	TEDGSEEPGSETSDAASTPT	-	-
tau 52-71 (A68)	499	TEDGSEEPGSETSDAKATPT	++	++
tau 52-71 (A69)	500	TEDGSEEPGSETSDAKSAPT	++	++
tau 52-71 (A70)	501	TEDGSEEPGSETSDAKSTAT	++	++
tau 52-71 (A71)	502	TEDGSEEPGSETSDAKSTPA	++	++

Таблица 29. Результаты аланинового сканирования для СВТАУ-49.1

Участок (Tau441)	SEQ ID NO	Последовательность пептида	Результаты
tau 52-71	382	TEDGSEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A52)	484	AEDGSEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A53)	485	TADGSEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A54)	486	TEAGSEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A55)	487	TEDASEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A56)	488	TEDGAEEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A57)	489	TEDGSAEPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A58)	490	TEDGSEAPGSETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A59)	491	TEDGSEEAGSETSDAKSTPT	-
tau 52-71 (A60)	492	TEDGSEEPASETSDAKSTPT	++
tau 52-71 (A61)	493	TEDGSEEPGAETSDAKSTPT	-
tau 52-71 (A62)	494	TEDGSEEPGSATSDAKSTPT	-
tau 52-71 (A63)	495	TEDGSEEPGSEASDAKSTPT	+
tau 52-71 (A64)	496	TEDGSEEPGSETADAKSTPT	+
tau 52-71 (A65)	497	TEDGSEEPGSETSAKSTPT	-
tau 52-71 (A67)	498	TEDGSEEPGSETSDAASTPT	-
tau 52-71 (A68)	499	TEDGSEEPGSETSDAKATPT	+
tau 52-71 (A69)	500	TEDGSEEPGSETSDAKSAPT	+
tau 52-71 (A70)	501	TEDGSEEPGSETSDAKSTAT	+
tau 52-71 (A71)	502	TEDGSEEPGSETSDAKSTPA	+

Несмотря на то что СВТАУ-7.1 и СВТАУ-8.1 выделяли с использованием тау-фосфопептида, содержащего эпитоп для AT8 (т.е. pS202, pT205), оба mAb характеризовались различными требованиями к эпитопу в соответствии с результатами аланинового сканирования (табл. 22). В дополнение к S202 и T205 замены в положениях G204 и P206 приводят к ослаблению связывания СВТАУ-7.1. В противоположность этому замены на аланин в положениях G204, T205, P206 и R209 уменьшали реактивность СВТАУ-8.1 по отношению к пептиду, а замена S202A не имела эффекта. Как и AT8, оба mAb являются фосфозависимыми, но требуют дополнительных (нефосфорилированных остатков) для связывания. Результаты аланинового сканирования для СВТАУ-22.1 показали зависимость от фосфорилирования в S422 (табл. 23), так как замена в этом положении полностью подавляла связывание. Замена в D421 приводила к ослаблению, но не к полному подавлению связывания. В заключение, результаты аланинового

сканирования для СВТАУ-24.1 показали, что P236 является единственным критически важным для связывания остатком (табл. 24).

Для картирования критически важных контактных остатков для СВТАУ-27.1 и 43.1 также проводили аланиновое сканирование в пределах участка 299-323 тау-белка (табл. 25 и табл. 27 соответственно). Было показано, что критически важными контактными остатками для связывания СВТАУ-27.1 являются D314, L315 и K317. Результаты позволяют предположить, что остатки D314 и K317 могут обеспечивать взаимодействия между эпитопом и остатками CDR в mAb посредством образования солевых мостиков. Хотя СВТАУ-43.1 выделяли с использованием родственного пептида для СВТАУ-27.1, критически важные остатки в соответствии с аланиновым сканированием были разными. В дополнение к L315 и K317 было показано, что пролин в положении 312 является важным контактным остатком для связывания СВТАУ-43.1. Наконец, также проводили аланиновое сканирование для СВТАУ-28.1, а также для СВТАУ-47.1, 47.1 и 49.1 (табл. 26, 28, 29). Как показано в примере 9, mAb СВТАУ 47.1, 47.2, 49.1 по результатам картирования соответствовали тому же пептидному участку, что и СВТАУ-28.1 (т.е. 52-71). Примечательно, что все mAb обладали требованиями к связыванию, идентичными СВТАУ-28.1. Было показано, что критически важными контактными остатками являются P59, S61, E62, T63, D65 и K67. Было обнаружено, что некоторые из этих остатков являются заряженными, что подразумевает важные взаимодействия по типу солевых мостиков между эпитопом и mAb.

Пример 11. Иммуногистохимическое исследование.

Полагают, что тау-патология инициируется в пределах энторинальной области коры (ЕС) и распространяется вдоль соединительных нейронных путей в гиппокампе перед переходом в кору. Для определения реактивности выделенных IgG к отложениям патогенного тау-белка вдоль этих нейронных путей ткани гиппокампа получали от 82-летнего здорового мужчины (без AD; Abcam, № по кат. ab4305) и 88-летнего мужчины с болезнью Альцгеймера (AD; Abcam, № по кат. ab4583) (Abcam). Кортикальные ткани получали от 71-летнего здорового (без AD) индивидуума и 71-летнего индивидуума с болезнью Альцгеймера (AD) (Banner Sun Health). В дополнение к AD, существует много неврологических нарушений, которые характеризуются тау-патологией, также известных как таупатии. Для расширения полученных результатов авторы настоящего изобретения тестировали выделенные mAb в тканях, полученных из лобных долей с прогрессирующим надъядерным параличом (PSP) и непрогрессирующим надъядерным параличом (без PSP), полученных соответственно от 73-летнего мужчины и 81-летней женщины (Biocchain). Ткани головного мозга депарафинировали и регидратировали путем промывания дважды в течение 10 мин в ксилоле (VWR International) с последующим промыванием дважды в течение 3 мин в 100% этаноле, дважды в течение 3 мин в 95% этаноле, трижды в течение 3 мин в 70% этаноле и один раз в течение 30 с в дистиллированной H₂O с использованием набора для окрашивания микропрепаратов Tissue-Tek® (VWR International). Срезы тканей подвергали демаскированию антигена под действием тепла с использованием цитратного буфера (10 mM лимонной кислоты, pH 6,0) для обнажения антигенных детерминант. Срезы затем инкубировали с блокирующим буфером [10% нормальной козьей сыворотки (Jackson ImmunoResearch, Inc.), 1% BSA и 0,3% Triton-X100 в PBS)] при RT в течение 1 ч. Избыток воды удаляли, и срезы тканей обводили гидрофобным барьерным карандашом ImmEdge (Vector Labs). Готовили влажную камеру путем покрытия нижней части ванночки для окрашивания H₂O, и срезы затем 3 раза промывали в PBS в течение 5 мин путем отсасывания. Активность эндогенной пероксидазы гасили в 10% H₂O₂ в течение 30 мин при RT. После гашения микропрепараты 3 раза промывали в PBS в течение 5 мин путем отсасывания. Микропрепараты затем блокировали в течение 1 ч при RT раствором 10% нормальной козьей сыворотки, 0,3% TritonX-100, 1% BSA в 1X PBS. Первичные антитела метили биотином, используя набор для мечения IgG человека Zenon (Life Technologies) согласно инструкциям производителя. В качестве отрицательного контроля использовали антитело человека, специфичное к RSV. Химеризированный человеческим Fc-участком вариант IgG AT8 использовали в качестве положительного контроля. После мечения первичные антитела разводили по отдельности в блокирующем буфере в концентрациях 5 и 20 мкг/мл. Для экспериментов по конкуренции пептидов 13,3 мкМ родственного пептида (т.е. пептида, используемого для выделения mAb в экспериментах по сортировке) предварительно инкубировали с первичным антителом в течение 30 мин при RT перед инкубированием со срезами тканей.

Срезы тканей инкубировали при RT в течение двух часов со 100 мкл разведенного первичного антитела, меченного биотином, или антитела, за которое конкурируют пептиды. После удаления антитела путем отсасывания проводили вторую фиксацию среза ткани в 4% формальдегиде в PBS, и его инкубировали в течение 15 мин при RT. Срезы 3 раза промывали в PBS в течение 5 мин путем отсасывания. Срезы затем инкубировали в течение 30 мин вместе со стрептавидиновым субстратом реагентом Vectastain ABC (Vector Labs) перед промыванием в PBS. Затем ткани проявляли субстратом DAB (Vector Labs) в присутствии никеля. Срезы затем 2 раза промывали в ddH₂O и оставляли для полного высыхания при RT перед заливкой в 50 мкл стабильной заливочной среды VectaMount (Vector Labs). В заключение, срезы тканей подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином (Vector Labs). Иллюстративные изображения получали с помощью прямого микроскопа Olympus BX-41, используя программное обеспечение MetaMorph.

Результаты иммуногистохимического исследования показаны на фиг. 5a-d. СВТАУ-7.1 и СВТАУ-

8.1 продемонстрировали положительную специфичную иммунореактивность в тканях головного мозга с AD, но не в тканях здорового головного мозга, что позволяет предположить связывание с отложениями патогенного тау-белка, присутствующими в пораженных тканях головного мозга. Эти антитела узнают AT8-положительные клубки из тау-белка и нейтрофильные нити в подобластях гиппокампа (фиг. 5a; энторинальная область коры) и коре головного мозга (фиг. 5b). Кроме того, в нескольких экспериментах в цитоплазме и отростках нейронов неизменно обнаруживали положительную иммунореактивность. Кроме того, CBTAU-18.1, 22.1 и 24.1 также тестировали в отношении срезов тканей гиппокампа и кортикальных тканей (фиг. 5a-b). Аналогично CBTAU-7.1 и CBTAU-8.1, все mAb вступали в специфичную реакцию с тау-белком в срезах тканей с AD, но не с тау-белком в срезах тканей без AD. Примечательно, что CBTAU-24.1, не специфичное к фосфорилированному тау-белку, вступает в специфичную реакцию с патологическим тау-белком в срезах тканей с AD, но не с тау-белком в срезах тканей без AD.

В заключение, CBTAU-16.1 и CBTAU-20.1 проявляют реактивность по отношению к тау-белку в срезах тканей как без AD, так и с AD.

Кроме того, CBTAU-7.1, 8.1, 16.1, 18.1, 20.1, 22.1 и 24.1 тестировали в срезах кортикальных тканей, соответствующих прогрессирующему надъядерному параличу (фиг. 5c). В отличие от AT8, CBTAU-7.1 и CBTAU-8.1 не смогли обнаружить клубки из тау-белка в головном мозге человека с PSP, что позволяет предположить, что эпитоп для обоих mAb отсутствует при PSP. CBTAU-16.1 и CBTAU-20.1 демонстрировали положительную иммунореактивность по отношению к тау-белку в кортикальных срезах головного мозга без PSP и с PSP, что позволяет предположить связывание как с нормальными формами тау-белка, так и с патогенными формами тау-белка. В срезах головного мозга без AD эти антитела продемонстрировали положительное иммуноокрашивание тау-белка в цитоплазме и отростках нейронов (фиг. 5a и 5b), при этом оба mAb обнаруживали клубки и нейтрофильные нити в срезах головного мозга с AD аналогично AT8. Аналогичную AT8 иммунореактивность по отношению к клубкам из тау-белка также обнаружили в срезах тканей головного мозга с PSP, что позволяет предположить, что как CBTAU-16.1, так и CBTAU-20.1 узнают типичные формы патогенного тау-белка при других таупатиях, отличных от AD. Кроме того, CBTAU-22.1 и CBTAU-24.1 демонстрировали иммунореактивность исключительно в тканях головного мозга с AD при положительной иммунореактивности к клубкам и нейтрофильным нитям. CBTAU-18.1 демонстрировало слабую иммунореактивность в тканях головного мозга без AD, но вступало в более интенсивную реакцию в образцах тканей с AD. CBTAU-18.1, CBTAU-22.1 и CBTAU-24.1 также обладали положительной реактивностью по отношению к клубкам из тау-белка в срезах тканей головного мозга с PSP (фиг. 5c).

CBTAU-27.1 и CBTAU-28.1 демонстрировали селективное иммуноокрашивание в срезах тканей головного мозга без AD с диффузным иммуноокрашиванием в цитоплазме и отростках нейронов. Примечательно, что оба антитела не смогли продемонстрировать иммунореактивность в срезах тканей с AD (как в тканях гиппокампа, так и в кортикальных тканях), определяя новый эпитоп, который утрачивается в ходе прогрессирования заболевания. В отличие от большинства mAb человека к тау-белку, идентифицированных авторами настоящего изобретения, CBTAU-27.1 и CBTAU-28.1 выделяли путем скрининга образцов доноров с использованием набора нефосфорилированных пептидов, охватывающих весь участок tau441 человека. Эти антитела не требуют фосфорилирования для связывания (фиг. 1) и, как показано на фиг. 2, не вступают в реакцию с PHF, что выявляется в ходе ELISA. Поэтому наблюдаемый для этих двух mAb диффузный характер иммуноокрашивания был ожидаемым. Кроме того, CBTAU-43.1, которое изначально выделили с использованием родственного пептида для CBTAU-27.1, тестировали в отношении срезов кортикальной ткани. CBTAU-43.1 вступало в реакцию аналогично CBTAU-27.1, окрашивая тау-белок в срезах тканей без AD, но не тау-белок в срезах тканей с AD. Аналогичным образом, CBTAU-46.1, 47.2 (тестировали только один вариант), и 49.1, которые выделяли с использованием родственного пептида для CBTAU-28.1, вступали в специфичную реакцию с тау-белком в срезах тканей без AD, но не в срезах тканей с AD (фиг. 5d). Интересно отметить, что все эти mAb имеют общие последовательности зародышевого типа генов тяжелой и легкой цепей (т.е. VH5-51 и VK4-1), связываются с одними и теми же участками в тау-белке и, как показано на фиг. 5d, обладают аналогичными иммуногистохимическими свойствами.

Результаты иммуногистохимического исследования, представленные в данном документе для CBTAU-7.1, 8.1, 18.1, 22.1, 24.1, 27.1 и 28.1, были подтверждены по нескольким участкам образцов головного мозга и тканей, соответствующих нескольким индивидуумам без AD и с AD. Иммунореактивность mAb CBTAU 43.1, 46.1, 47.2 и 49.1 была в свое время подтверждена при использовании того же образца ткани и еще не была подтверждена на образцах, соответствующих другим индивидуумам с AD и без AD.

Пример 12. ИНС с дефосфорилированием.

Учитывая, что результаты ИНС для CBTAU-28.1 продемонстрировали иммунореактивность по отношению к тау-белку в срезах тканей без AD, но не к тау-белку в срезах тканей с AD, авторы настоящего изобретения выдвинули гипотезу, что утрата этого эпитопа в ходе прогрессирования заболевания была результатом модификации(модификаций) (т.е. фосфорилирования). Для тестирования этой гипотезы срезы тканей головного мозга человека дефосфорилировали перед оцениванием иммунореактивности

CBTAU-28.1. Залитые в парафин срезы тканей головного мозга человека (Abscam, № по кат. ab4305, от 54-летнего мужчины без клинических симптомов в сравнении с Abscam, № по кат. ab4583, от 93-летней женщины латиноамериканского происхождения с болезнью Альцгеймера) депарафинировали и регидратировали путем промывания дважды в течение 10 мин в ксилоле (VWR International) с последующим промыванием дважды в течение 3 мин в 100% этаноле, дважды в течение 3 мин в 95% этаноле, трижды в течение 3 мин в 70% этаноле и один раз в течение 30 с в дистиллированной H₂O с использованием набора для окрашивания микропрепаратов Tissue-Tek® (VWR International). Чтобы свести к минимуму неспецифичное связывание антитела, тканям при промываниях никогда не позволяли высохнуть. Срезы тканей подвергали демаскированию антигена под действием тепла с использованием цитратного буфера (лимонная кислота, pH 6,0) для обнажения антигенных детерминант. Избыток воды удаляли и срезы тканей обводили гидрофобным барьерным карандашом ImmEdge (Vector Labs). Готовили влажную камеру путем покрытия нижней части ванночки для окрашивания H₂O и срезы затем 3 раза промывали в PBS в течение 5 мин путем отсасывания. Активность эндогенной пероксидазы гасили в H₂O₂ в течение 15 мин при RT. После гашения микропрепараты 3 раза промывали в PBS в течение 5 мин путем отсасывания. Срезы после этого обрабатывали 130 ед./мл кишечной щелочной фосфатазы телянка (CIAP) в течение 2,5 ч при 32°C. Микропрепараты затем блокировали в течение 1 ч при RT раствором 10% нормальной козьей сыворотки, 0,3% TritonX-100, 1% BSA в 1X PBS. Муринизированное антитело CBTAU-28.1 (муринизированный Fc-участок) и контрольные mAb AT8 и изотипический контроль (mAb 4.1 к RSV) инкубировали в течение ночи на срезах гиппокампа в конечной концентрации 1 мкг/мл. Срезы промывали и инкубировали с антителом, специфичным к Fc-фрагменту иммуноглобулина мыши, в течение 2 ч при комнатной температуре. Образцы проявляли раствором субстрата пероксидазы DAB в присутствии никеля. Образцы подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином (Vector Labs). Иллюстративные изображения получали с помощью прямого микроскопа Olympus BX-41, используя программное обеспечение MetaMorph.

Результаты показаны на фиг. 6a и b. Как и ожидалось, CBTAU-28.1 вступает в реакцию с тау-белком, присутствующем в срезах тканей гиппокампа без AD, но не вступает в реакцию с тау-белком в срезах тканей с AD. В противоположность этому контрольное mAb AT8 не вступает в реакцию с тау-белком в срезах без AD, но однозначно вступает в реакцию с отложениями патогенного тау-белка, присутствующими в срезах тканей с AD (фиг. 6a). Однако предварительная обработка срезов тканей с AD фосфатазой восстанавливает реактивность CBTAU-28.1, позволяя ему окрашивать отложения патогенного тау-белка, присутствующие в этих срезах. Как и ожидалось, реактивность AT8 при предварительной обработке срезов тканей с AD фосфатазой снижалась (фиг. 6b).

Пример 13. ELISA с дефосфорилированием.

Для подтверждения результатов из примера 12 дефосфорилированные парные спиральные филаменты тестировали на реактивность по отношению к CBTAU-28.1 посредством ELISA. 96-луночные планшеты для связывания с половинным объемом лунок (Costar) покрывали 50 мкл антигена в TBS (2 мкг/мл бычьего актина и антитела козы к F(ab)₂-фрагменту человека, очищенного аффинной хроматографией, и 1 мкг/мл аффинно очищенных парных спиральных филаментов iPHF, подвергнутых и не подвергнутых предварительной обработке кишечной фосфатазой телянка (CIP). iPHF, обработанный фосфатазой, получали следующим образом. Образцы iPHF ресуспендировали в 1X буфере NEB 4 (50 mM ацетата калия, 20 mM Tris-ацетата, 10 mM ацетата магния и 1 mM DTT) в конечной концентрации 0,05 мкг/мл. Добавляли одну единицу CIP на мкг iPHF (CIP, NEB, № по кат. M0290S). Образцы iPHF инкубировали с CIP в течение 90 мин при 37°C перед покрыванием планшетов для связывания для ELISA. После связывания антигена в течение ночи планшеты промывали в TBS-T и затем блокировали 150 мкл TBS с 2,5% BSA в течение 2 ч при RT. Очищенные контрольные IgG и IgG к тау-белку CBTAU-28.1 титровали в 5-кратных разведениях, начиная с 25 мкг/мл в TBS/0,25% BSA, и инкубировали в течение 1,5 ч. Планшеты промывали 4 раза в TBS-T и добавляли вторичное антитело (антитело к Fab человека, конъюгированное с HRP, Jackson Immunoresearch, № по кат. 109-036-097) и инкубировали при RT в течение 45 мин. После инкубирования планшеты промывали 4 раза в TBS-T и проявляли субстратом пероксидазы для микролунок SureBlue Reserve TMB (KPL) в течение примерно 2 мин. Реакцию немедленно останавливали посредством добавления останавливающего раствора TMB (KPL) и измеряли поглощение при 450 нм, используя планшет-ридер для ELISA. Для каждой экспериментальной точки использовали три повторности.

Результаты показаны на фиг. 7. Как раньше было показано в примере 7, CBTAU-28.1, в отличие от AT8, вступает в слабую реакцию с iPHF, что выявляется в ходе ELISA. Однако, дефосфорилирование iPHF с помощью CIP восстанавливает реактивность CBTAU-28.1 по отношению к образцам филаментов. Как и ожидалось, реактивность контрольного mAb AT8 по отношению к фосфо-тау-белку устраняется после дефосфорилирования iPHF с помощью CIP.

Пример 14. Реактивность CBTAU-27.1, 28.1, 43.1, 47.1, 47.2 и 49.1 по отношению к фосфопептидам.

Результаты иммуногистохимического исследования для CBTAU-27.1 (а также CBTAU-43.1) и CBTAU-28.1 (а также CBTAU-46.1, 47.2, 49.1) позволяют предположить, что эти mAb вступают в реакцию с эпитопом на тау-белке, который присутствует в срезах нормальных тканей без AD, но утрачивает-

ся или маскируется в ходе формирования заболевания (фиг. 5). Авторы настоящего изобретения выдвинули гипотезу, что это было обусловлено явлением фосфорилирования в пределах участка, которое приводит к маскировке эпитопа(эпитопов). Эксперименты, освещенные в примерах 12 и 13, показали, что это действительно было справедливым для 28.1. Таким образом, авторы настоящего изобретения желали конкретно определить сайт(сайты), которые могут быть потенциально намечены для фосфорилирования и обуславливать утрату реактивности СВТАУ-28.1. Поскольку 47.1, 47.2 и 49.1 связываются с тем же участком на тау-белке, что и СВТАУ-28.1 (т.е. 52-71), авторы настоящего изобретения решили протестировать также и эти mAb в данных экспериментах. Кроме того, авторы настоящего изобретения также произвели те же действия для СВТАУ-43.1 и СВТАУ-27.1, поскольку они ведут себя аналогично СВТАУ-28.1, что выявляется в ходе ИНС.

Тау-пептиды с одинарным и двойным фосфорилированием были предназначены для охвата всех потенциальных сайтов фосфорилирования в участках 52-71 и 299-323 (участках связывания для СВТАУ-28.1 и СВТАУ-27.1 соответственно). mAb СВТАУ-27.1 и СВТАУ-43.1 тестировали в отношении пептидов, перечисленных в табл. 30 и 32. 96-луночные планшеты для ELISA, покрытые стрептавидином (Pierce), покрывали фосфорилированными тау-пептидами, как подробно описано в примере 9. Очищенные IgG к тау-белку разводили до 5 мкг/мл в TBS, содержащем 0,25% BSA, и титровали в 5-кратных разведениях. Контрольное антитело и вторичные антитела использовали, как подробно описано в примере 9. Реактивность антител при 1 мкг/мл определяли посредством ELISA и оценивали как отсутствие связывания (-), слабую (-/+), среднюю (+) или сильную (++). (-) для среднего значения двух показателей O.D. при 450 нм < 0,3; (-/+) для > 0,5 и < 1,0; (+) для > 1,0 и < 1,5; (++) для > 1,5. Результаты для каждого антитела показаны в таблицах 30-34 и на фиг. 8.

Таблица 30. СВТАУ-27.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.		Результат
tau 299-369	331	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKP GGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGG GNK	++
tau 299-323	458	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
ptau 299-323 p305	503	HVPGGG (pS) VQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
ptau 299-323 p310	504	HVPGGGSVQIV (pY) KPVDSLKVTSKCG	++
ptau 299-323 p316	505	HVPGGGSVQIVYKPVDL (pS) KVTSKCG	-
ptau 299-323 p319	506	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKV (pT) SKCG	++
ptau 299-323 p320	507	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKV (pS) KCG	++
ptau 299-323 p305, 310	508	HVPGGG (pS) VQIV (pY) KPVDSLKVTSKCG	++
ptau 299-323 p305, 316	509	HVPGGG (pS) VQIVYKPVDL (pS) KVTSKCG	-
ptau 299-323 p305, 320	510	HVPGGG (pS) VQIVYKPVDSLKV (pT) SKCG	++
ptau 299-323 p305, 321	511	HVPGGG (pS) VQIVYKPVDSLKV (pS) KCG	++
ptau 299-323 p310, 316	512	HVPGGGSVQIV (pY) KPVDL (pS) KVTSKCG	-
ptau 299-323 p310, 320	513	HVPGGGSVQIV (pY) KPVDSLKV (pT) SKCG	++
ptau 299-323 p310, 321	514	HVPGGGSVQIV (pY) KPVDSLKV (pS) KCG	++
ptau 299-323 p316, 320	515	HVPGGGSVQIVYKPVDL (pS) KV (pT) SKCG	-
ptau 299-323 p316, 321	516	HVPGGGSVQIVYKPVDL (pS) KVT (pS) KCG	-
ptau 299-323 p320, 321	517	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKV (pT) (pS) KCG	-/+

Таблица 31. СВТАУ-28.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.		Результат
tau 42-103	325	GLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDV TAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGTTA	++
tau 48-71	518	LQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPT	++
ptau 48-71 (p71)	519	LQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTP (pT)	++
ptau 48-71 (p63)	520	LQTPTEDGSEEPGSE (pT) SDAKSTPT	-
ptau 48-71 (p61)	521	LQTPTEDGSEEPG (pS) ETSDAKSTPT	-
ptau 48-71 (p56)	522	LQTPTEDG (pS) EEPGSETSDAKSTPT	++
ptau 48-71 (p52)	523	LQTP (pT) EDGSEEPGSETSDAKSTPT	++
ptau 48-71 (p68)	524	LQTPTEDGSEEPGSETSDAK (pS) TPT	++
ptau 48-71 (p69)	525	LQTPTEDGSEEPGSETSDAKS (pT) PT	++
ptau 48-71 (p64)	526	LQTPTEDGSEEPGSET (pS) DAKSTPT	++
ptau 48-71 (p61, p64)	527	LQTPTEDGSEEPG (pS) ET (pS) DAKSTPT	-
ptau 48-71 (p61, p63)	528	LQTPTEDGSEEPG (pS) E (pT) SDAKSTPT	-
ptau 48-71 (p63, p64)	529	LQTPTEDGSEEPGSE (pT) (pS) DAKSTPT	-

Таблица 32. СВТАУ-43.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.		Результат
tau 299-369	331	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKP GGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGG GNK	++
tau 299-323	458	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
ptau 299-323 p305	503	HVPGGG (pS) VQIVYKPVDSLKVTSKCG	++
ptau 299-323 p310	504	HVPGGGSVQIV (pY) KPVDSLKVTSKCG	++
ptau 299-323 p316	505	HVPGGGSVQIVYKPVDL (pS) KVTSKCG	-
ptau 299-323 p319	506	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKV (pT) SKCG	++
ptau 299-323 p320	507	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKV (pS) KCG	++
ptau 299-323 p305, 310	508	HVPGGG (pS) VQIV (pY) KPVDSLKVTSKCG	++
ptau 299-323 p305, 316	509	HVPGGG (pS) VQIVYKPVDL (pS) KVTSKCG	-
ptau 299-323 p305, 320	510	HVPGGG (pS) VQIVYKPVDSLKV (pT) SKCG	++
ptau 299-323 p305, 321	511	HVPGGG (pS) VQIVYKPVDSLKV (pS) KCG	++
ptau 299-323 p310, 316	512	HVPGGGSVQIV (pY) KPVDL (pS) KVTSKCG	-
ptau 299-323 p310, 320	513	HVPGGGSVQIV (pY) KPVDSLKV (pT) SKCG	++
ptau 299-323 p310, 321	514	HVPGGGSVQIV (pY) KPVDSLKV (pS) KCG	++
ptau 299-323 p316, 320	515	HVPGGGSVQIVYKPVDL (pS) KV (pT) SKCG	-/+

ptau 299-323 p316, 321	516	HVPGGGSVQIVYKPVDL (pS) KVT (pS) KCG	-
ptau 299-323 p320, 321	517	HVPGGGSVQIVYKPVDSLKV (pT) (pS) KCG	++

Таблица 33. CBTAU-47.1 и CBTAU-47.2: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.		Результат для CBTAU-47.1	Результат для CBTAU-47.2
tau 42-103	325	GLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSD AKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQA AAQPHTIPEGTTA	++	++
tau 48-71	518	LQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPT	++	++
ptau 48-71 (p71)	519	LQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTP (pT)	++	++
ptau 48-71 (p63)	520	LQTPTEDGSEEPGSE (pT) SDAKSTPT	-	-
ptau 48-71 (p61)	521	LQTPTEDGSEEPG (pS) ETSDAKSTPT	-	-
ptau 48-71 (p56)	522	LQTPTEDG (pS) EEPGSETSDAKSTPT	++	++
ptau 48-71 (p52)	523	LQTP (pT) EDGSEEPGSETSDAKSTPT	++	++
ptau 48-71 (p68)	524	LQTPTEDGSEEPGSETSDAK (pS) TPT	++	++
ptau 48-71 (p69)	525	LQTPTEDGSEEPGSETSDAKS (pT) PT	++	++
ptau 48-71 (Ser64)	526	LQTPTEDGSEEPGSET (pS) DAKSTPT	++	++
ptau 48-71 (p61, Ser64)	527	LQTPTEDGSEEPG (pS) ET (pS) DAKSTPT	-	-
ptau 48-71 (p61, p63)	528	LQTPTEDGSEEPG (pS) E (pT) SDAKSTPT	-	-
ptau 48-71 (p63, p64)	529	LQTPTEDGSEEPGSE (pT) (pS) DAKSTPT	-	-

Таблица 34. CBTAU-49.1: пептиды для определения реактивности в ходе ELISA

Пептид	SEQ ID NO.		Результат
tau 42-103	325	GLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVT APLVDEGAPGKQAAAQPHT EIPEGTTA	++

tau 48-71	518	LQTPTEGSEEPGSETSDAKSTPT	++
ptau 48-71 (p71)	519	LQTPTEGSEEPGSETSDAKSTP (pT)	++
ptau 48-71 (p63)	520	LQTPTEGSEEPGSE (pT) SDAKSTPT	-
ptau 48-71 (p61)	521	LQTPTEGSEEPG (pS) ETSDAKSTPT	-
ptau 48-71 (p56)	522	LQTPTEG (pS) EEPGSETSDAKSTPT	++
ptau 48-71 (p52)	523	LQTP (pT) EDGSEEPGSETSDAKSTPT	++
ptau 48-71 (p68)	524	LQTPTEGSEEPGSETSDAK (pS) TPT	++
ptau 48-71 (p69)	525	LQTPTEGSEEPGSETSDAKS (pT) PT	-/+
ptau 48-71 (Ser64)	526	LQTPTEGSEEPGSET (pS) DAKSTPT	++
ptau 48-71 (p61, Ser64)	527	LQTPTEGSEEPG (pS) ET (pS) DAKSTPT	-
ptau 48-71 (p61, p63)	528	LQTPTEGSEEPG (pS) E (pT) SDAKSTPT	-
ptau 48-71 (p63, p64)	529	LQTPTEGSEEPGSE (pT) (pS) DAKSTPT	-

Результаты для СВТАУ-27.1 и СВТАУ-43.1 демонстрируют, что фосфорилирование по S316 является достаточным для полного подавления реактивности (табл. 30 и 32). Это позволяет предположить, что утрата реактивности по отношению к тау-белку в срезах тканей с АД (пример 11) может быть результатом фосфорилирования по S316, явления, которое может происходить на ранней стадии течения заболевания. Для СВТАУ-28.1, 47.1, 47.2, 49.1 фосфорилирование по S61 либо T63 является достаточным для полного подавления реактивности. В совокупности результаты для СВТАУ-28.1, 47.1, 47.2 и 49.1 позволяют предположить, что фосфорилирование по S61 и/или T63 является механизмом, который обуславливает утрату этого эпитопа в ходе течения заболевания.

Пример 15. Образование химерных mAb мыши/человека и изотипов mAb человека к тау-белку.

Для тестирования эффективности mAb человека к тау-белку в мышинной модели таупатии образовывали химерные антитела мыши/человека посредством замены Fc-участка человека на Fc IgG1 мыши. Вкратце, CH1-участок IgG1 человека амплифицировали из вектора pCB-IgG, используя праймеры прямой Step1NMchim и обратный Step1NMchim (табл. 35), с образованием фрагмента размером 0,95 т.п.о., содержащего сайт 5'-XhoI (фрагмента 1). CH2- и CH3-домены (Fc-участок) IgG1 мыши амплифицировали из синтезированной генетической конструкции, используя праймеры прямой Step2NMchim и обратный Step2NMchim (табл. 30), с образованием фрагмента размером 0,82 т.п.о. (фрагмента 2). Третий фрагмент (фрагмент 3), который включает в себя сайт 3'-DraIII, образовывали путем амплификации поли-A-участка вектора pCB-IgG, используя праймеры прямой Step3NMchim и обратный Step3NMchim (табл. 30). Эти три фрагмента соединяли в одну кассету посредством ПЦР с перекрывающимися праймерами с образованием перекрывающегося фрагмента размером 2,3 т.п.о, содержащего CH1 человека, за которым расположены CH2-CH3-домены мыши. Перекрывающийся фрагмент затем клонировали с помощью сайтов XhoI и DraIII в вектор pCB-IgG СВТАУ-7.1 с образованием химерного СВТАУ-7.1 мыши/человека, содержащего вариативный, CH1-, шарнирный и Сκ-участки человека, за которыми расположены CH2 и CH3-участки мыши. Химерные СВТАУ-22.1, 24.1, 27.1, 28.1, 47.1, 47.2, 46.1, 49.1 и 43.1 затем образовывали путем расщепления химерной конструкции СВТАУ-7.1 и конструкций pCB-IgG СВТАУ mAb человека с помощью XhoI и XbaI и соответствующие фрагменты субклонировали. Нуклеотидные последовательности для всех конструкций проверяли согласно стандартным методикам, известным специалистам в данной области. Химерные антитела затем экспрессировали и очищали, как подробно описано в примере 5, используя белок G на агарозе вместо белка А.

Таблица 35. Праймеры для получения химерных форм мыши/человека

ID праймера	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК (5'-3')	SEQ ID NO:
Прямой Step1NMchim	TCTCCGCCGGTGAGTCTCGAGGC	530
Обратный Step1NMchim	TGTCCCTGGATGCAGGCTACTCTAGG	531

Прямой Step2HMchim	AGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAG	532
Обратный Step2HMchim	TCTAGATCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAG	533
Прямой Step3HMchim	TCTCCTGGTAAATGATCTAGAGTTTAAACCGCTG	534
Обратный Step3HMchim	ATGGCCCACTACGTGAACCATCACC	535

Пример 16. Получение изотипов IgG2, 3 и 4.

Как упоминалось в примере 3, все mAb CBTAU клонировали и экспрессировали в виде химерного IgG1 человека независимо от их изначального изотипа. Для образования дополнительных вариантов изотипов человека (т.е. IgG2/3/4) участки CH1-CH3, соответствующие каждому изотипу IgG человека, амплифицировали посредством ПЦР из синтезированной генетической конструкции, содержащей соответствующие последовательности константного участка, шарнирного участка и интрона. ПЦР-ампликоны содержали сайты 5'-XhoI и 3'-DraIII, используемые для субклонирования фрагментов в соответствующую конструкцию антитела pCB-IgG CBTAU. Таким образом, для каждого mAb к тау-белку образовывали варианты изотипов IgG2, 3 и 4 человека.

Пример 17. Образование вариантов химерных моноклональных антител к тау-белку со сниженным риском и сконструированным Fc.

Вариабельные участки тяжелой и легкой цепи (VH и VL) для каждого клона антитела к тау-белку, выделенного в примере 3, анализировали на наличие свободных цистеиновых остатков и потенциальных сайтов посттрансляционных модификаций, включающих сайты гликозилирования, дезамидирования и окислирования. Для изменения этих сайтов использовали аминокислотные мутации, состоящие из структурно консервативных замен и/или замен в последовательностях зародышевого типа. Неконсервативные цистеиновые остатки в вариабельных участках подвергали мутации по типу замены на серин. Для сайтов гликозилирования использовали несколько мутаций, включая замену аспарагина на консервативный глутамин или мутации в последовательностях зародышевого типа. Модификации в сайтах дезамидирования включали замену аспарагиновой кислоты на аспарагин и серина или аланина на глицин. Сайты потенциального окислирования не подвергали модификации. Для повышения аффинности связывания с FcRn и увеличения таким образом периода полужизни mAb IgG1 in vivo создавали несколько мутаций, расположенных на границе между CH2 и CH3-участком. Эти мутации включали M252Y/S254T/T256E в комбинации с H433K/N434F (Vaccaro C. et al., 2005) или T250Q/M428L (Hinton P.R. et al., 2004), которые, как было показано, усиливают связывание IgG1 с FcRn. Все замены создавали путем сайт-направленного мутагенеза согласно инструкциям производителя (QuickChange II, Agilent Technologies, № по кат. 200521). Нуклеотидные последовательности для всех конструкций проверяли согласно стандартным методикам, известным специалистам в данной области техники.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое:

- а) связывает тау-белок в нормальной ткани головного мозга человека, и
- б) не связывает тау-белок в ткани головного мозга человека с болезнью Альцгеймера (AD), и содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 201, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 202 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 203, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 204, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 205 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 206.

2. Моноклональное антитело, которое:

- а) связывает тау-белок в нормальной ткани головного мозга человека, и
- б) не связывает тау-белок в ткани головного мозга человека с AD, и содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 207, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 208 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 209, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 210, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 211 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212.

3. Моноклональное антитело, которое:

- а) связывает тау-белок в нормальной ткани головного мозга человека, и
- б) не связывает тау-белок в ткани головного мозга человека с AD, и содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 222, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 223 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 224, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 225, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 226.

4. Моноклональное антитело, которое:

- а) связывает тау-белок в нормальной ткани головного мозга человека, и
- б) не связывает тау-белок в ткани головного мозга человека с AD, и содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 238, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 239 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 240, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 241, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 242.

5. Моноклональное антитело, которое:

- а) связывает тау-белок в нормальной ткани головного мозга человека, и

b) не связывает тау-белок в ткани головного мозга человека с AD,
и содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 243, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 244 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 245, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 246, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212.

6. Моноклональное антитело, которое:

a) связывает тау-белок в нормальной ткани головного мозга человека, и
b) не связывает тау-белок в ткани головного мозга человека с AD,
и содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 243, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 247 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 248, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 249, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 173 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 212.

7. Моноклональное антитело, которое:

a) связывает тау-белок в нормальной ткани головного мозга человека, и
b) не связывает тау-белок в ткани головного мозга человека с AD,
и содержит CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 250, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 251 и CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 252, CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 254, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 254 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 255.

8. Антитело по п.1, содержащее антигенсвязывающий участок VH с SEQ ID NO: 115 и VL с SEQ ID NO: 116.

9. Антитело по п.2, содержащее антигенсвязывающий участок VH с SEQ ID NO: 119 и VL с SEQ ID NO: 120.

10. Антитело по п.3, содержащее антигенсвязывающий участок VH с SEQ ID NO: 135 и VL с SEQ ID NO: 136.

11. Антитело по п.4, содержащее антигенсвязывающий участок VH с SEQ ID NO: 147 и VL с SEQ ID NO: 148.

12. Антитело по п.5, содержащее антигенсвязывающий участок VH с SEQ ID NO: 151 и VL с SEQ ID NO: 152.

13. Антитело по п.6, содержащее антигенсвязывающий участок VH с SEQ ID NO: 155 и VL с SEQ ID NO: 156.

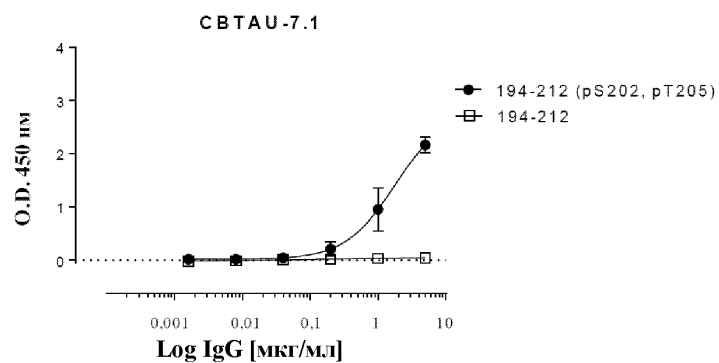
14. Антитело по п.7, содержащее антигенсвязывающий участок VH с SEQ ID NO: 159 и VL с SEQ ID NO: 160.

15. Антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-14.

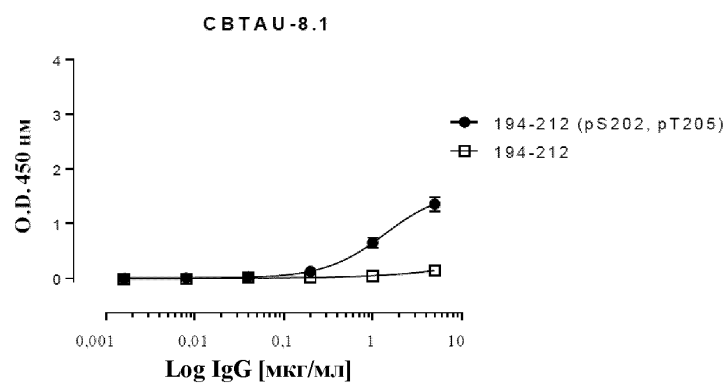
16. Клетка-хозяин для получения антитела по любому из пп.1-14 или антигенсвязывающего фрагмента по п.15, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

17. Способ получения антитела по любому из пп.1-14 или антигенсвязывающего фрагмента по п.15, включающий культивирование клетки-хозяина по п.16 и выделение антитела или его фрагмента, полученного с помощью клетки-хозяина.

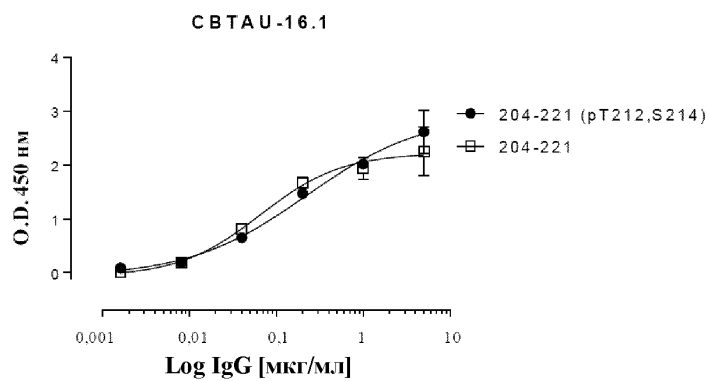
18. Фармацевтическая композиция для лечения нейродегенеративных таутопатий, которая содержит антитело по любому из пп.1-14 или антигенсвязывающий фрагмент по п.15 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель.



a)

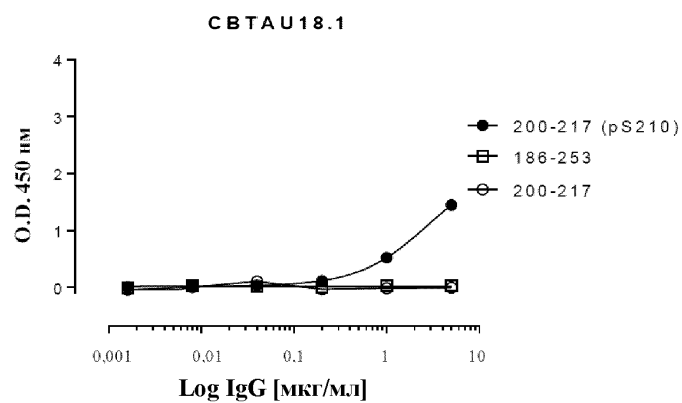


b)

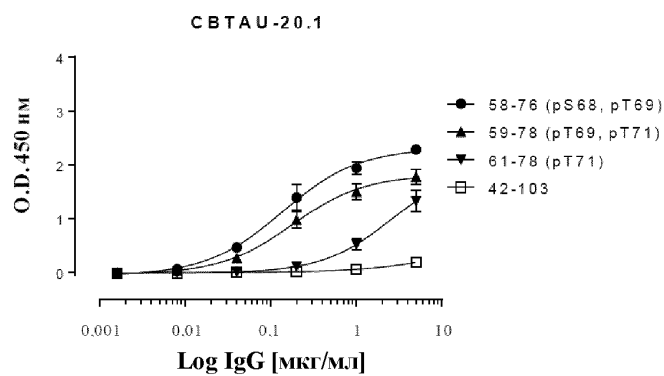


c)

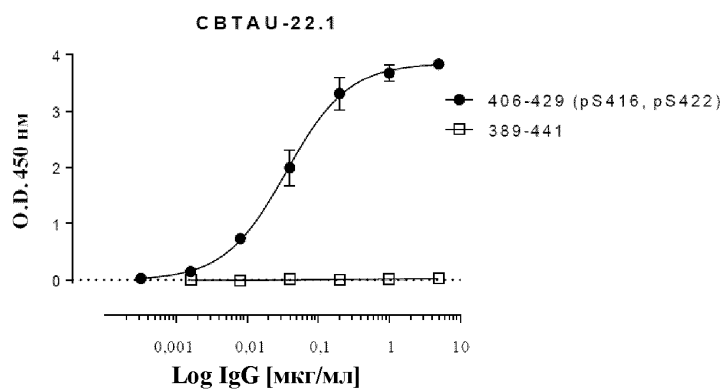
Фиг. 1a-с



d)

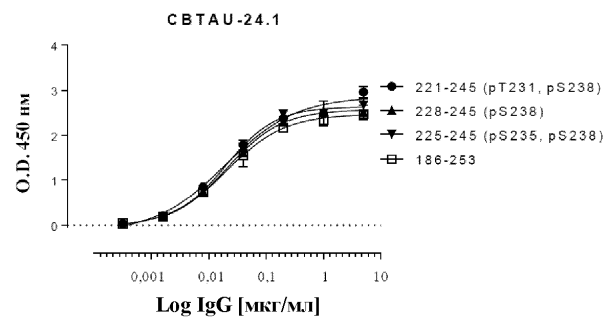


e)

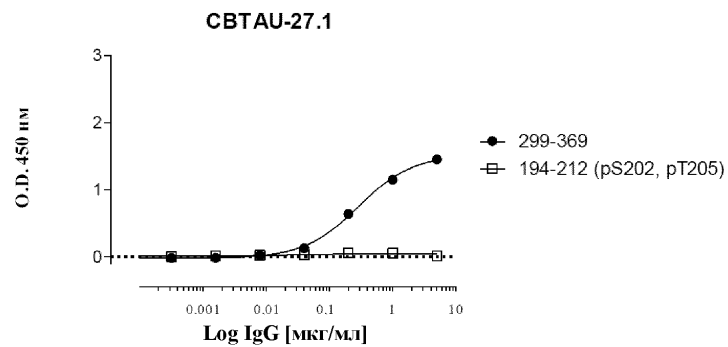


f)

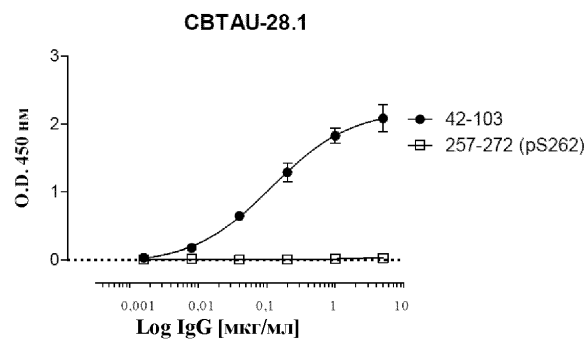
Фиг. 1d-f



g)



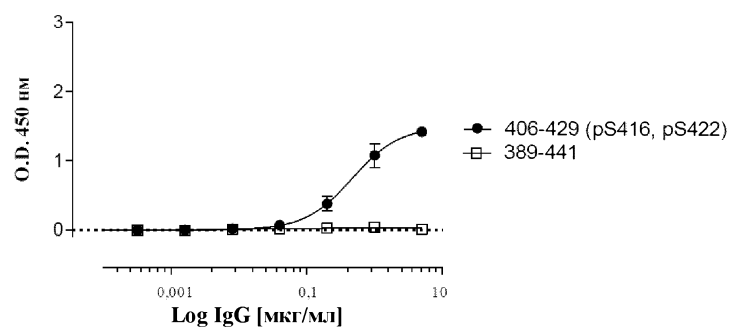
h)



i)

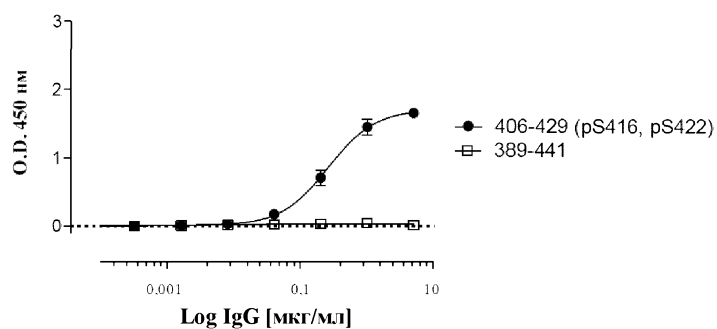
Фиг. 1g-i

CBTAU-41.1



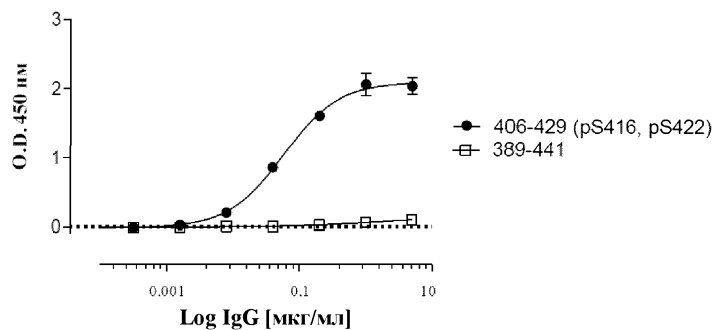
j)

CBTAU-41.2



k)

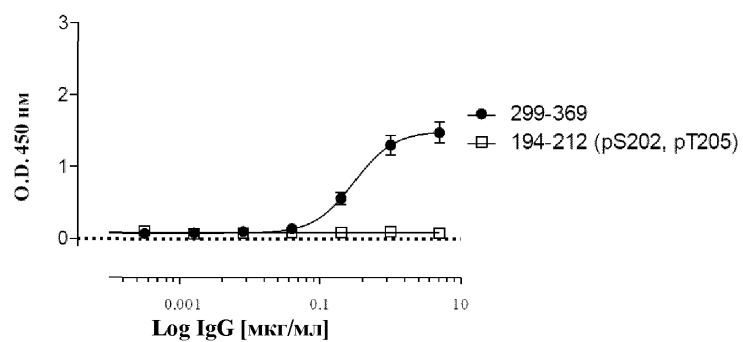
CBTAU-42.1



l)

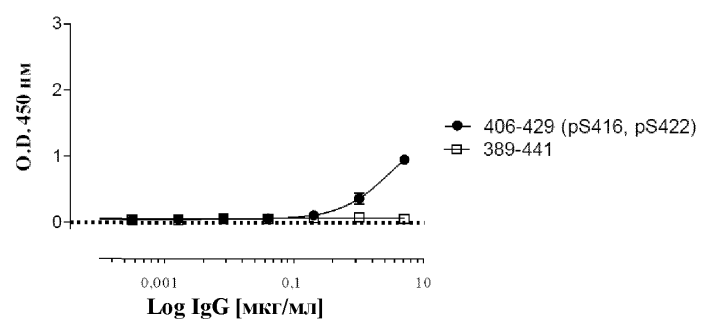
Фиг. 1j-l

CBTAU-43.1



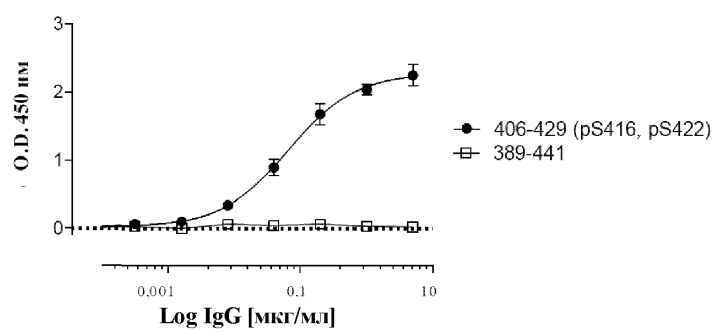
m)

CBTAU-44.1



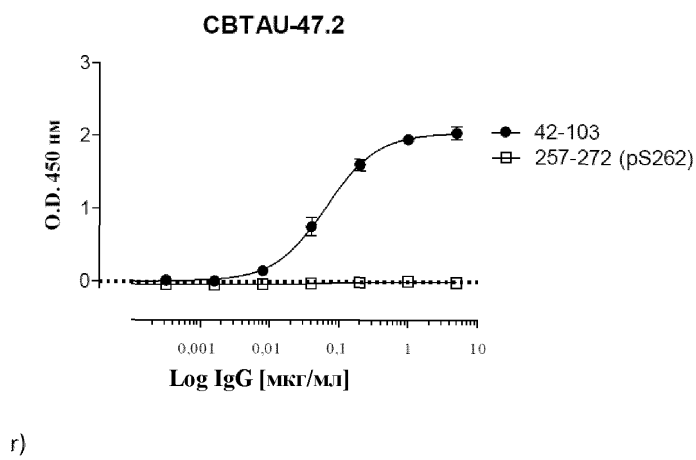
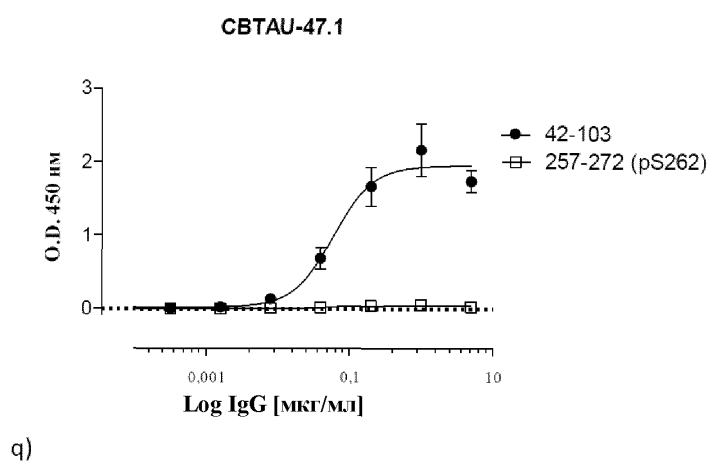
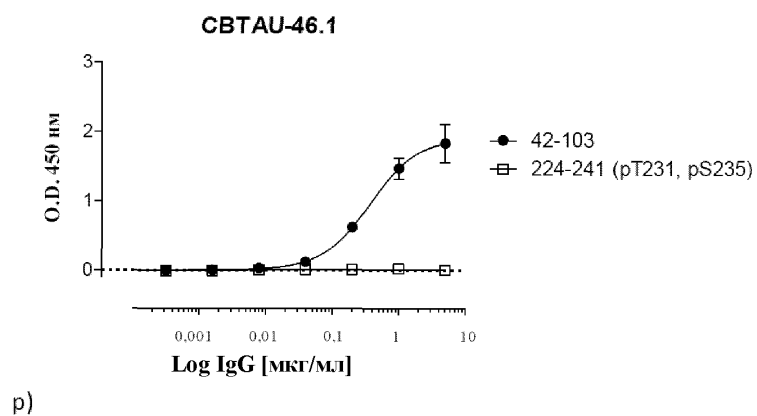
n)

CBTAU-45.1

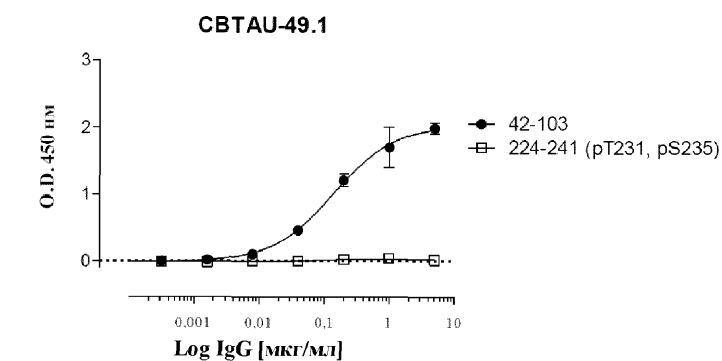


o)

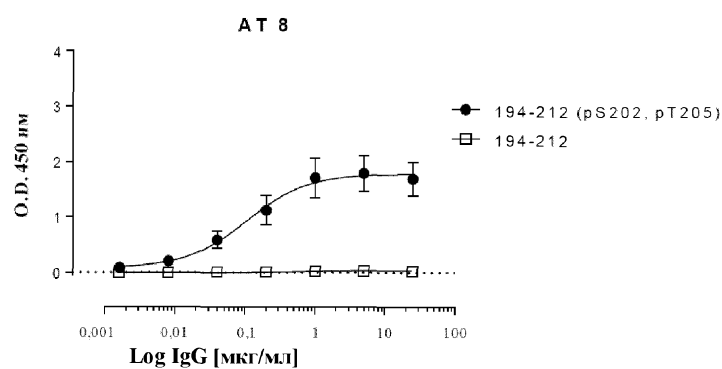
Фиг. 1m-o



Фиг. 1р-г

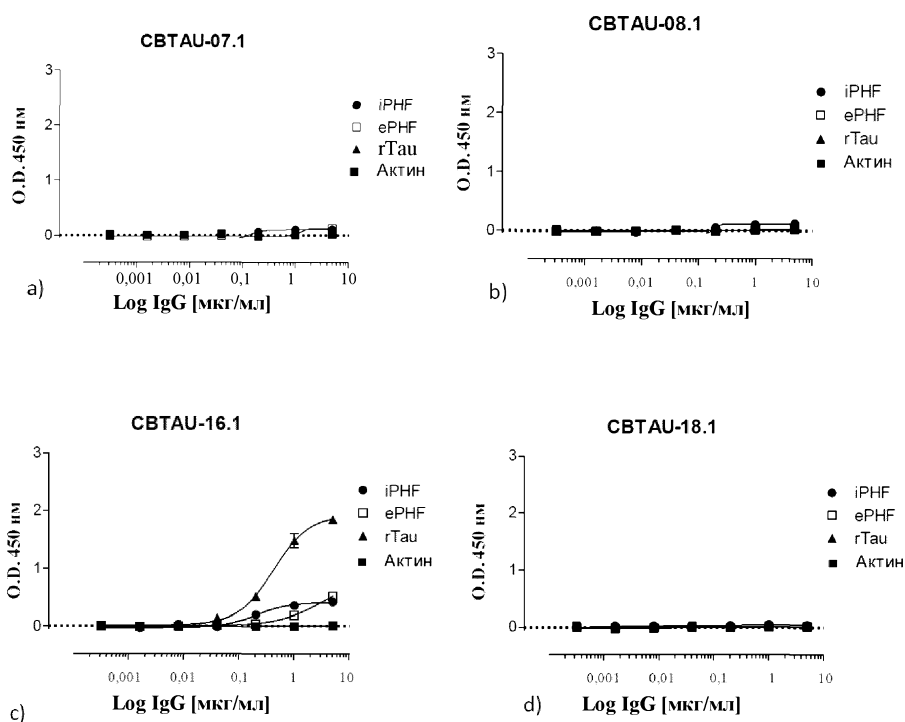


s)

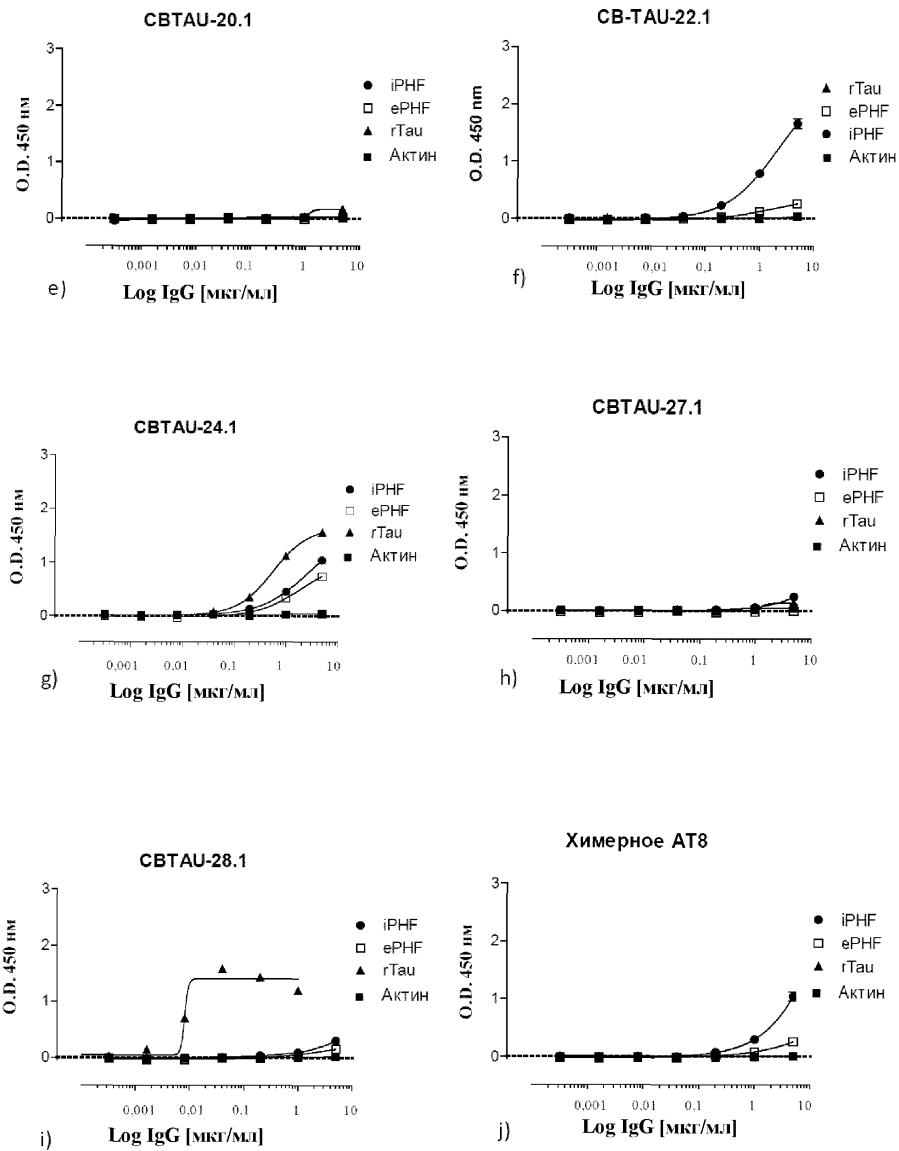


t)

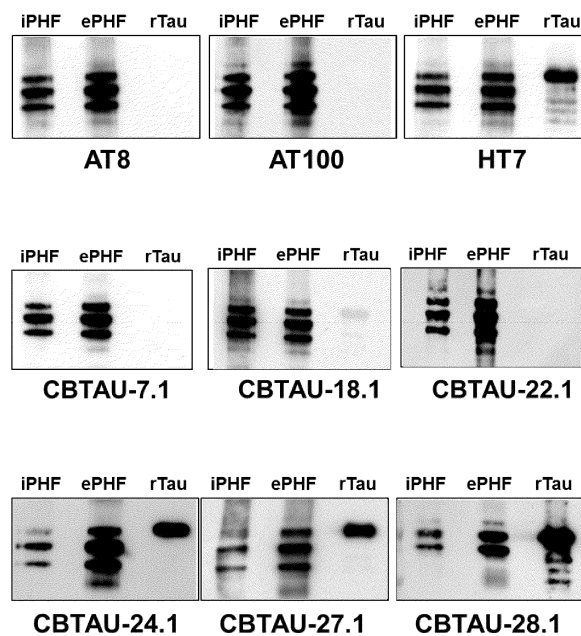
Фиг. 1s,t



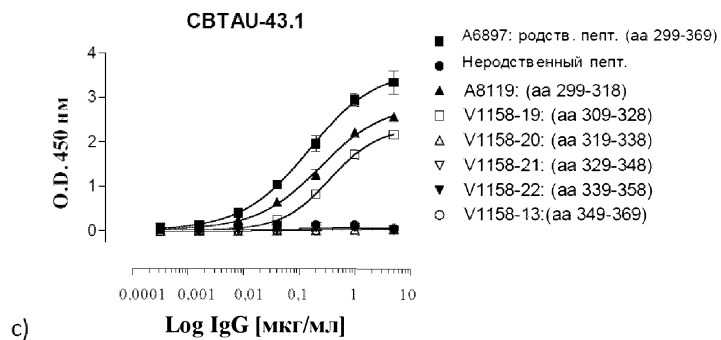
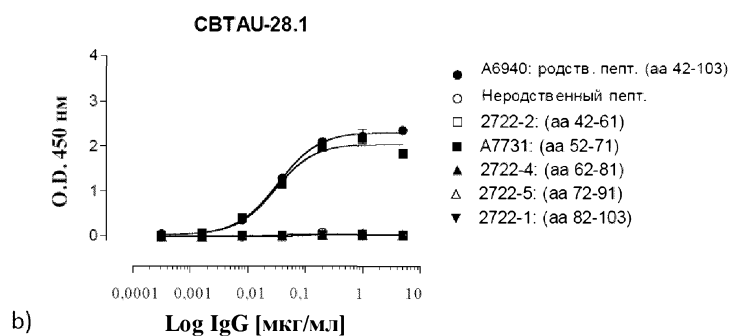
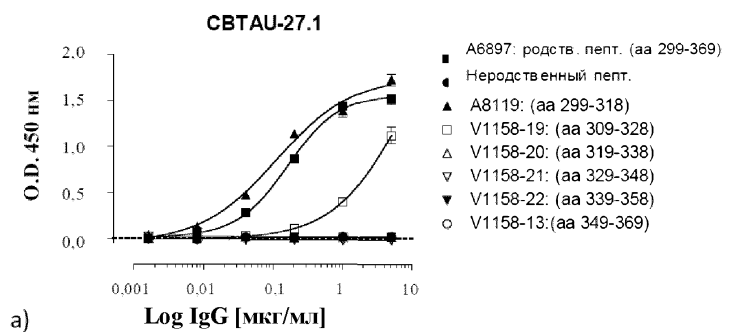
Фиг. 2a-d



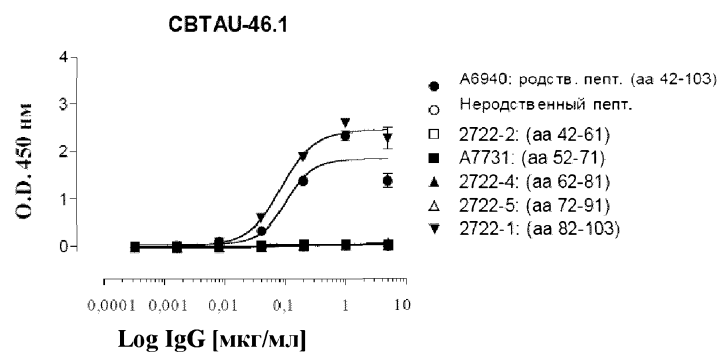
Фиг. 2е-ж



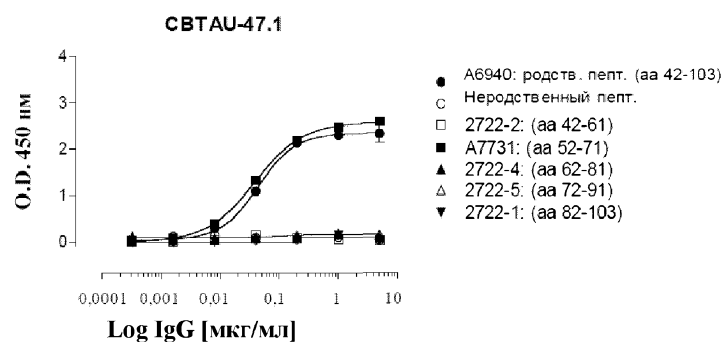
Фиг. 3



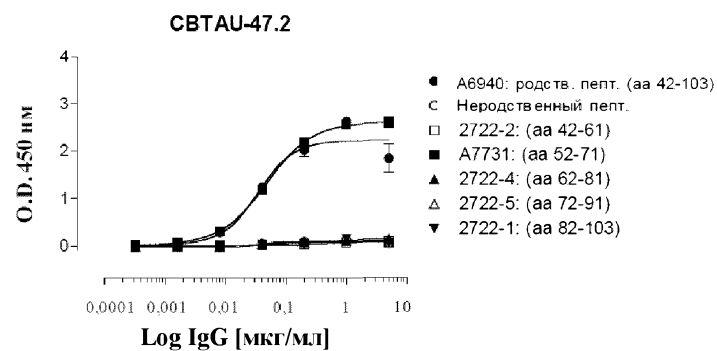
Фиг. 4а-с



d)

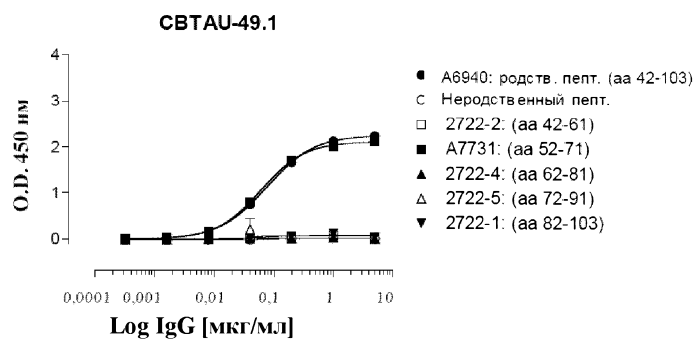


e)



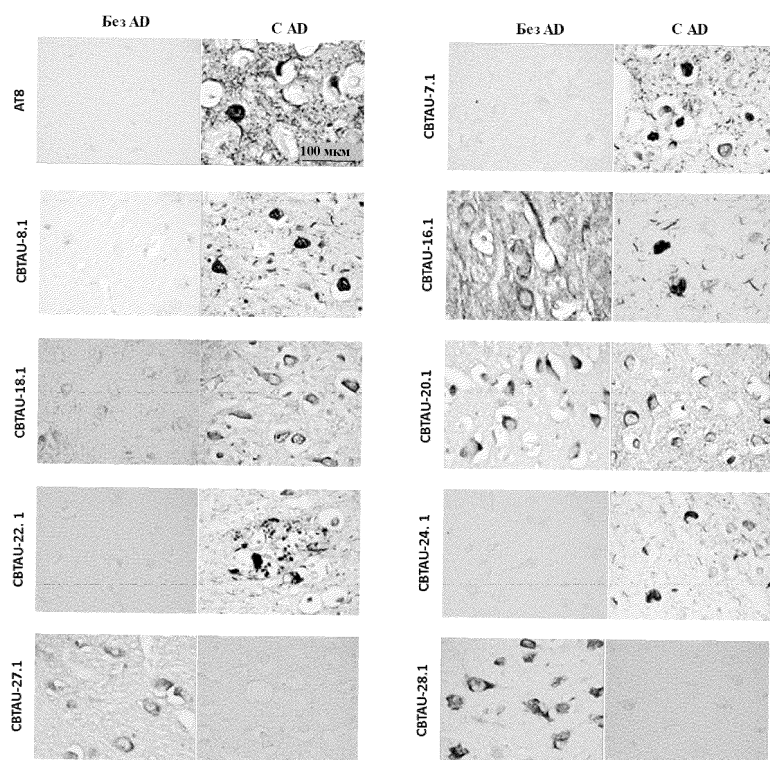
f)

Фиг. 4d-f

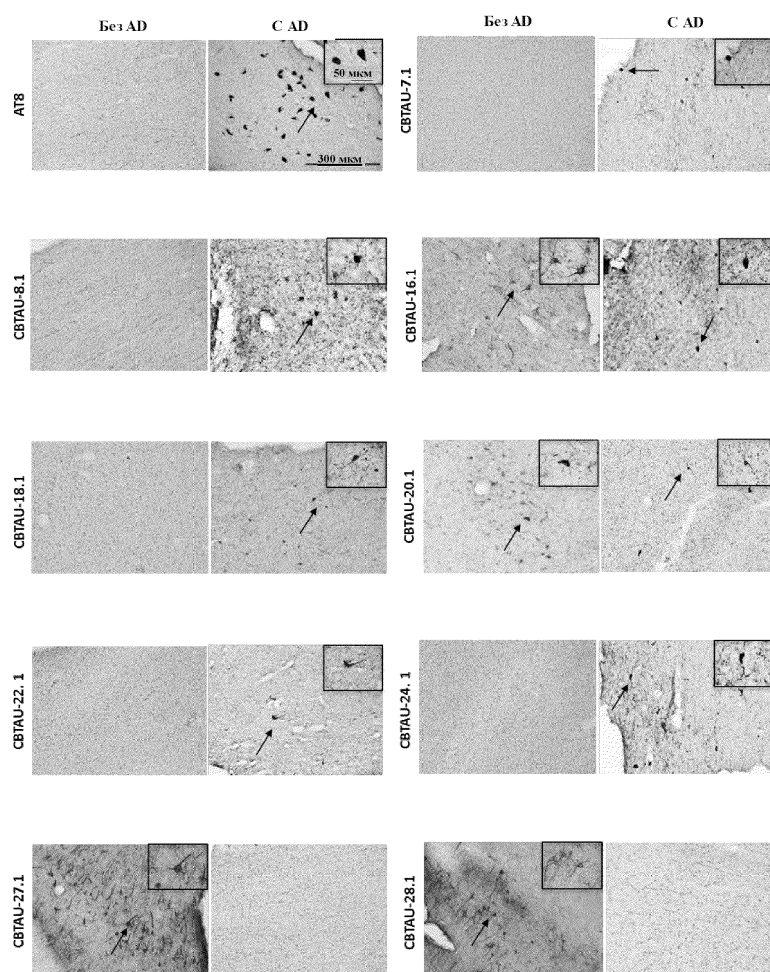


g)

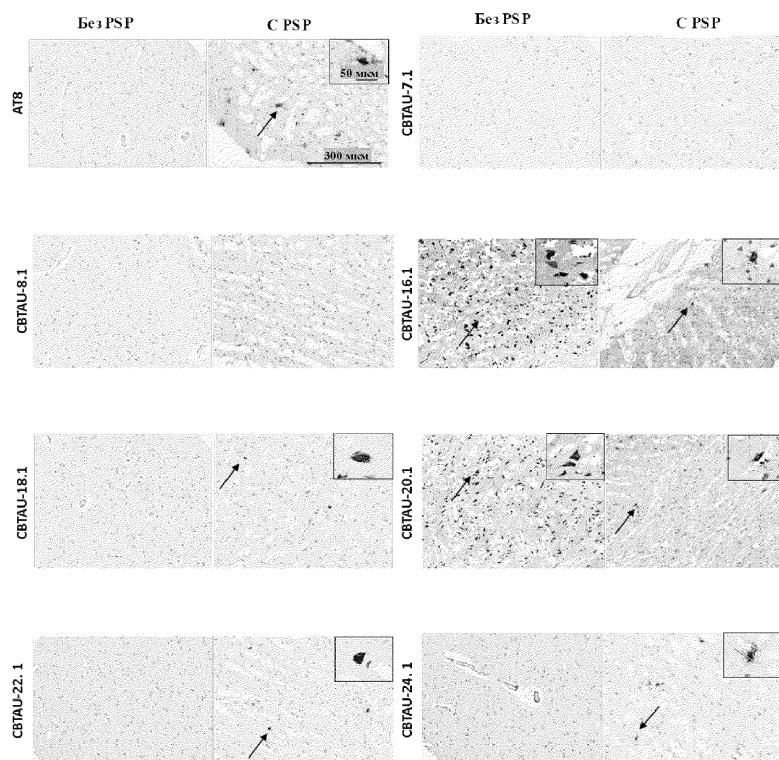
Фиг. 4g



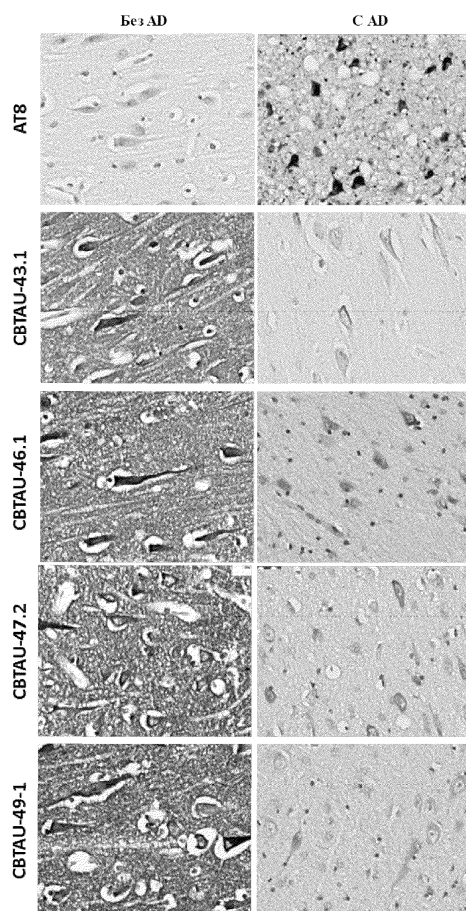
Фиг. 5a



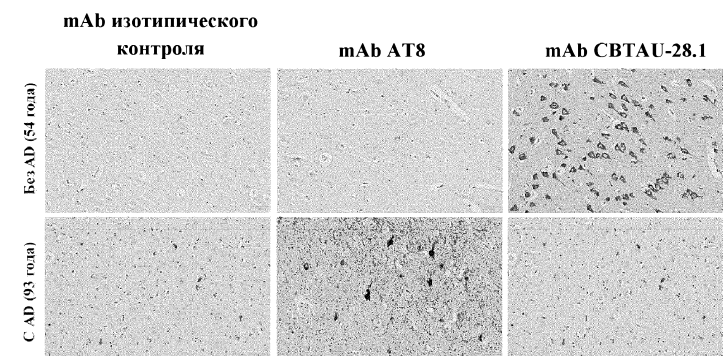
Фиг. 5b



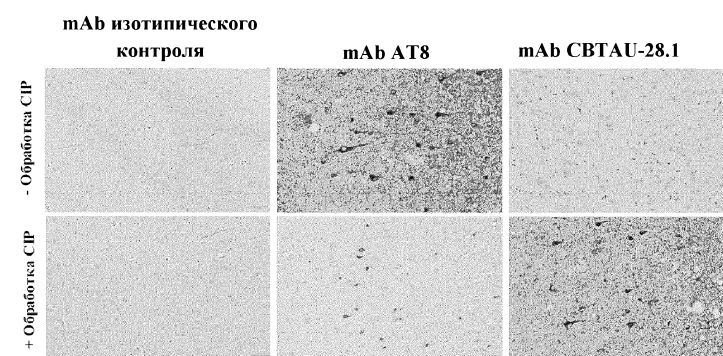
Фиг. 5с



Фиг. 5d

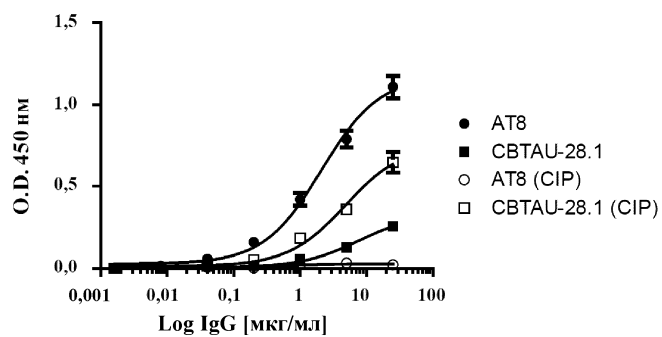


а)

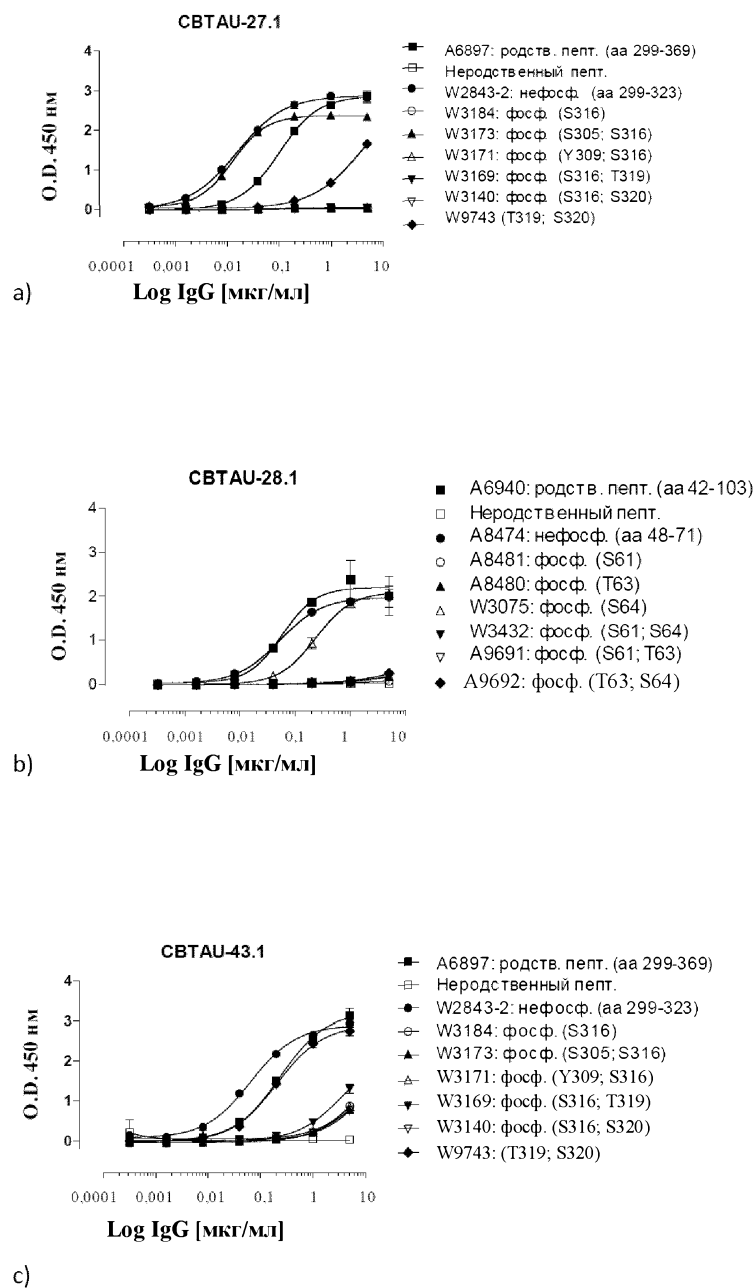


б)

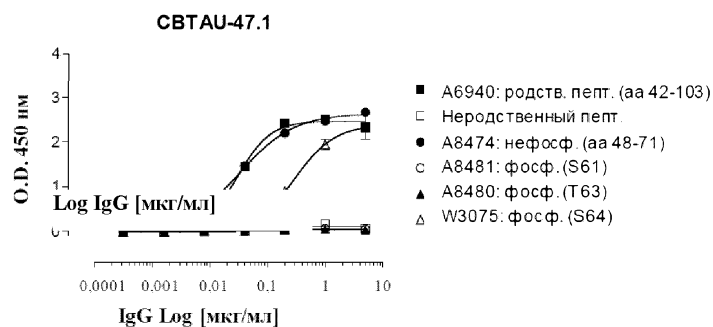
Фиг. 6



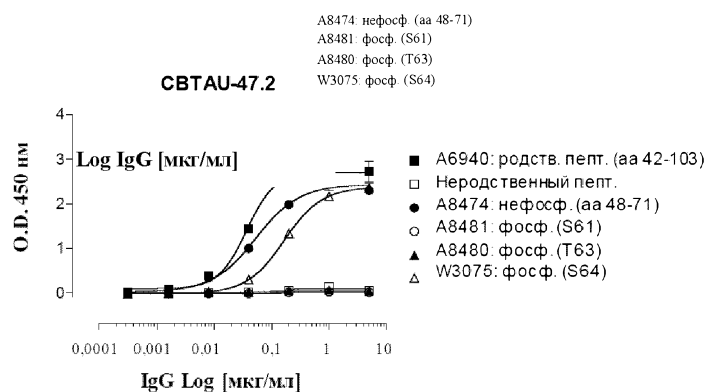
Фиг. 7



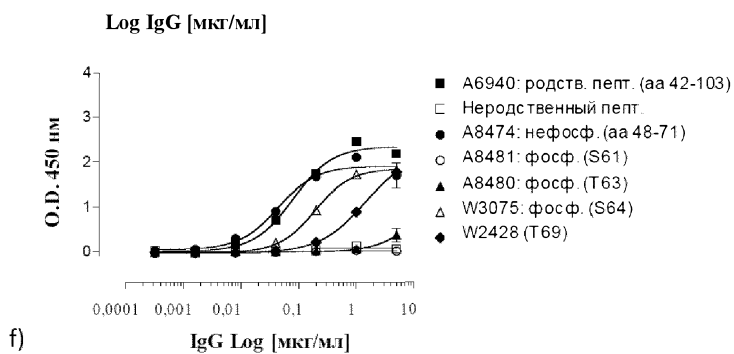
Фиг. 8а-с



d)



e)



f)

Фиг. 8d-f



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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