

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21)

201592203

(13)

A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.05.31

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.06.09

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ТАУПАТИИ

(31) 61/833,355; PCT/US2013/055203;
14/092,539

(57) В настоящем изобретении предусматриваются способы лечения таупатии, включающие введение антитела к Tau. В настоящем изобретении предусматриваются также антитела к Tau и композиции, содержащие их, для применения в этих способах.

(32) 2013.06.10; 2013.08.15; 2013.11.27

(33) US

(86) PCT/US2014/041553

(87) WO 2014/200921 2014.12.18

(71) Заявитель:

АЙПИЕРИАН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Грисвold-Преннер Ирэн, Стаглиано
Нэнси Е., Дан Ву Цао, Хуссейн Сами,
Брайт Джессика Мишель (US)

(74) Представитель:

Угрюмов В.М. (RU)

201592203

A1

A1

201592203

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ТАУПАТИИ

Данная заявка претендует на положительный эффект заявки США на патент № 14/092,539, поданной 27 ноября 2013 г., международной заявки № PCT/US2013/055203, поданной 15 августа 2013 г. и предварительной заявки США на патент № 61/833,355, поданной 10 июня 2013 г., каждая из которых полностью включена в данную заявку посредством отсылки.

ВВЕДЕНИЕ

Ассоциированный с микротрубочками Тау-белок содержится в больших количествах в центральной нервной системе и в основном синтезируется нейронами. Основная функция Тау-белка состоит в стабилизации микротрубочек. В мозге взрослого человека содержатся шесть изоформ Тау-белка, эти изоформы являются продуктами альтернативного сплайсинга индивидуального гена.

Таупатии относятся к классу нейродегенеративных заболеваний, возникающих в результате патологической агрегации Тау-белка в так называемых нейрофибриллярных узлах (NFT) в мозге. Некоторые примеры таупатий включают лобно-височную деменцию (FTD), болезнь Альцгеймера, прогрессирующий надъядерный паралич, кортико-базальную дегенерацию и лобно-височную лобарную дегенерацию. В уровне техники существует необходимость в способах лечения таупатий и в реагентах, которые пригодны для применения при осуществлении таких способов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предусматривает способы лечения таупатии, включающие введение антитела к Тау-белку. Данное изобретение предусматривает также антитела к тау-белку и композиции, содержащие их, для использования при осуществлении таких способов.

ХАРАКТЕРНЫЕ ПРИЗНАКИ

Настоящее изобретение относится к способу снижения уровней А β_{40} и/или А β_{42} в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости субъекта, при этом способ включает введение субъекту: а) эффективного количества антитела, которое связывает эпитоп в N-концевой области внеклеточного Тау (“eTay”)-полипептида; или б) фармацевтической композиции, содержащей такое антитело. Согласно некоторым вариантам антитело связывает эпитоп с аминокислотами 1-158 eTay. Согласно некоторым вариантам антитело связывает эпитоп с аминокислотами 2-68 eTay. Согласно некоторым вариантам антитело связывает эпитоп с аминокислотами 15-24 e-Tay. Согласно некоторым вариантам эпитоп находится в Тау-полипептиде, содержащем аминокислотную

последовательность, идентичную SEQ ID NO:48 по меньшей мере на 95 % (eTay4). Согласно некоторым вариантам антитело связывает эпитоп с аминокислотами 7-13, 25-30, 19-46 или 150-158 Tay-белка. Согласно некоторым вариантам антитело является гуманизированным антителом. Согласно некоторым вариантам антитело связывает линейный эпитоп. Согласно некоторым вариантам антитело связывается с эпитопом специфически независимо от степени фосфорилирования аминокислот в эпитопе. Согласно некоторым вариантам антитело конкурирует при связывании с эпитопом с антителом, которое включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок (домен) VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и б) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; and (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. Согласно некоторым вариантам, когда антитело представляет собой гуманизированное антитело, это гуманизированное антитело включает область тяжёлой цепи изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Согласно некоторым вариантам, когда антитело представляет собой гуманизированное антитело, это гуманизированное антитело представляет собой фрагмент Fv, scFv, Fab, F(ab')2 или Fab'. Согласно некоторым вариантам антитело вводится внутривенно, интратекально или подкожно. Согласно некоторым вариантам внеклеточная жидкость является цереброспинальной (спинномозговой) жидкостью, интерстициальной жидкостью, кровью или фракцией крови (например, фракцией крови, такой как плазма или сыворотка). Согласно некоторым вариантам антитело включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; (iii) участок VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и б) область тяжёлой цепи, включающую: (i) участок VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность,

представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12.

Настоящее изобретение предусматривает способ лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением фрагментов Аβ у субъекта, причём этот способ включает введение субъекту: а) эффективного количества антитела, которое связывает эпитоп на N-концевом участке внеклеточного Tau (eTau)-полипептида или б) фармацевтической композиции, содержащей такое антитело. Согласно некоторым вариантам антитело связывает эпитоп в пределах аминокислот 1-158 eTau. Согласно некоторым вариантам антитело связывает эпитоп в пределах аминокислот 2-68 eTau. Согласно некоторым вариантам антитело связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 eTau, в пределах аминокислот 25-30 eTau, в пределах аминокислот 7-13 eTau или в пределах аминокислот 19-46 eTau. Согласно некоторым вариантам эпитоп находится на Tau-полипептиде, содержащем аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO:48 по меньшей мере на 95 % (eTau4). Согласно некоторым вариантам антитело представляет собой гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам антитело связывает линейный эпитоп. Согласно некоторым вариантам антитело связывается с эпитопом специфически независимо от степени фосфорилирования аминокислот в эпитопе. Согласно некоторым вариантам антитело при связывании с эпитопом конкурирует с антителом, которое включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и б) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. Согласно некоторым вариантам, когда антитело представляет собой гуманизированное антитело, это гуманизированное антитело включает область тяжёлой цепи изотипа IgG1, IgG2, IgG3, или IgG4. Согласно некоторым вариантам, когда антитело представляет собой гуманизированное антитело, это гуманизированное антитело представляет собой фрагмент Fv, scFv, Fab, F(ab')2 или Fab'. Согласно некоторым вариантам антитело вводится внутривенно, интрапекально или подкожно. Согласно некоторым вариантам внеклеточная жидкость является цереброспинальной жидкостью, интерстициальной

жидкостью, кровью или фракцией крови (например, фракцией крови, такой как плазма или сыворотка). Согласно некоторым вариантам антитело включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; (iii) участок VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и б) область тяжёлой цепи, включающую: (i) участок VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. Согласно некоторым вариантам заболевание, подвергающееся лечению, представляет собой болезнь Альцгеймера.

Настоящее изобретение предусматривает способ снижения уровня полипептида амилоида-бета в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости у субъекта, причём этот способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей: а) эффективное количество антитела, которое связывает эпитоп на N-концевом участке внеклеточного Tay (e-Tay)- полипептида; и б) фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное гуманизированное антитело, которое снижает уровень фрагментов А β ₄₀ и/или А β ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости у субъекта, при этом антитело специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 1-158 на изоформе 2N4R-Tay. Согласно некоторым вариантам антитело специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 2-18 Tay. Согласно некоторым вариантам антитело специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 7-13, или в пределах аминокислот 25-30 Tay. Согласно некоторым вариантам антитело специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24, в пределах аминокислот 2-68, или в пределах аминокислот 19-46 Tay. Согласно некоторым вариантам антитело специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 28-126 изоформы Tay 2N4R. Согласно некоторым вариантам антитело специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 150-158 изоформы Tay 2N4R. Согласно некоторым вариантам антитело связывает линейный эпитоп. Согласно некоторым вариантам эпитоп находится в пределах Tay-полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO:48 по меньшей мере на 95 % (eTay4). Согласно некоторым вариантам антитело при

связывании с эпитопом конкурирует с антителом, которое включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и б) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. Согласно некоторым вариантам антитело включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и б) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. Согласно любому из вариантов, описанных выше, антитело специфически связывается с эпитопом независимо от фосфорилирования аминокислот в эпитопе. Данное изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую: а) выделенное гуманизированное антитело, описанное выше или далее в данной заявке, и б) фармацевтически приемлемый эксквициент.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное гуманизированное моноклональное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Tay-полипептида. В некоторых случаях эпитоп не содержит фосфорилированной аминокислоты. В некоторых случаях эпитоп не содержит нитрованной аминокислоты. В некоторых случаях эпитоп содержит фосфорилированную аминокислоту, нитрованную аминокислоту или и фосфорилированную аминокислоту, и нитрованную аминокислоту.

Данное изобретение предусматривает выделенное антитело, содержащее каркасную область гуманизированной лёгкой цепи и каркасную область

гуманизированной тяжёлой цепи, при этом выделенное антитело при связывании с эпитопом на N-концевом участке Тау-полипептида конкурирует с антителом, которое включает а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. В некоторых случаях область лёгкой цепи и область тяжёлой цепи находятся в разных полипептидах. В некоторых случаях область лёгкой цепи и область тяжёлой цепи находятся в одном полипептиде. В некоторых случаях область тяжёлой цепи представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых случаях область тяжёлой цепи представляет собой изотип IgG4. В некоторых случаях шарнирная область содержит замену S241P. См., например, Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105. В некоторых случаях антитело представляет собой фрагменты Fv, scFv, Fab, F(ab')2 или Fab'. В некоторых случаях антитело содержит ковалентно связанный непептидный синтетический полимер, например, полиэтиленгликоль. В некоторых случаях антитело связано, непосредственно или через линкер, с молекулой носителя, пептида или белка, что способствует переносу (транспорту) через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида. В некоторых случаях область каркасного участка гуманизированной лёгкой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, что показано в Таблице 3. В некоторых случаях область каркасного участка гуманизированной тяжёлой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, или 12 аминокислотных замен, что показано в Таблице 2.

Настоящее антитело предусматривает выделенное антитело, причём антитело представляет собой фрагмент Fv, scFv, Fab, F(ab')2 или Fab', и при этом антитело при связывании с эпитопом в N-концевой области Тау-полипептида конкурирует с антителом, которое включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок VL CDR3, содержащий

аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной лёгкой цепи. В некоторых случаях каркасный участок гуманизированной лёгкой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислотных замен, показанных в Таблице 3. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной тяжёлой цепи. В некоторых случаях каркасный участок гуманизированной тяжёлой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, показанных в Таблице 2.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело, при этом такое выделенное антитело содержит константную область лёгкой цепи человека и константную область тяжёлой цепи человека и выделенное антитело при связывании эпитопом в N-концевой области Tay-полипептида конкурирует с антителом, которое включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12.

Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую: а) антитело к Tay-белку по данному изобретению и б) фармацевтически приемлемый эксквициент.

Настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую: а) антитело, которое специфически связывается с эпитопом в N-концевой области Tay, при этом антитело включает: (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную

SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; (iv) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (v) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (vi) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12; и b) фармацевтически приемлемый эксципиент, пригодный для введения человеку, при этом композиция не содержит эндотоксинов. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной лёгкой цепи. В некоторых случаях каркасный участок гуманизированной лёгкой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислотных замен, показанных в Таблице 3. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной тяжёлой цепи. В некоторых случаях каркасный участок гуманизированной тяжёлой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, показанных в Таблице 2.

В некоторых случаях антитело является инкапсулированным в липосому. В некоторых случаях антитело содержится вместе с агентом, который облегчает перенос через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях антитело связано, непосредственно или через линкер, с молекулой носителя, пептида или белка, что способствует переносу через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях антитело представляет собой фрагмент Fv, scFv, Fab, F(ab')2 или Fab'.

Настоящее изобретение предусматривает рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к Тау-белку по изобретению, при этом нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом транскрипционного контроля, который проявляет активность в эукариотной клетке. Настоящее изобретение предусматривает *in vitro* клетку-хозяина, генетически модифицированную рекомбинантным экспрессионным вектором согласно данному изобретению.

Настоящее изобретение предусматривает стерильный контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по изобретению. В некоторых случаях контейнер является шприцом.

Настоящее изобретение предусматривает способ лечения таупатии у субъекта, который включает введение субъекту антитела к Тау-белку по изобретению или фармацевтической композиции, которая его содержит.

Настоящее изобретение предусматривает способ лечения таупатии у субъекта, который включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей: а)

антитело, которое при связывании с эпитопом в N-концевом участке Tau-полипептида конкурирует с антителом, которое включает: i) гипервариабельные участки, распознающие антиген (CDRs), лёгкой цепи антитела, показанного на Фигуре 1В; и CDRs тяжёлой цепи антитела, показанного на Фигуре 2А; и b) фармацевтически приемлемый эксципиент, подходящий для введения композиции человеку. В некоторых случаях антитело включает: (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; (iv) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (v) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (vi) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной лёгкой цепи. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной тяжёлой цепи. В некоторых случаях антитело инкапсулировано в липосому. В некоторых случаях антитело содержится вместе с агентом, который облегчает перенос через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях антитело связано, непосредственно или через линкер, с молекулой носителя, пептида или белка, что промотирует перенос через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях антитело представляет собой фрагмент Fv, scFv, Fab, F(ab')2 или Fab'. Согласно некоторым вариантам антитело вводится внутривенно. Согласно некоторым вариантам антитело вводится интракальвально.

В некоторых случаях введение субъекту антитела к Tau приводит к изменению одного или более параметров: a) количества свободного внеклеточного Tau в тканях мозга; b) количества свободного внеклеточного Tau в интерстициальной жидкости (ISF); c) количества свободного внеклеточного Tau в цереброспинальной жидкости (CSF) (ликворе); d) передачи Tau от нейрона к нейрону; e) количества агрегатов интранейронных сплетений Tau; f) степени активации микроглиальных клеток и/или астроцитов; g) количества фосфорилированного или гиперфосфорилированного Tau; h) количества тотального Tau или свободного Tau в ISF или CSF; i) количества внутриклеточных N-концевых фрагментов Tau; j) гиперактивности нейронов; k) количества А β 40 и/или А β 42 в CSF; l) объёма бляшек А β ; m) секреции А β 40 и/или А β 42 нейронами; n) активности промотора предшественника амилоида (APP); o) уровня мРНК

APP и/или белка; р) активности бета-секретазы и/или гамма-секретазы; q) состояния активации А β -индуцированного сигнального пути; r) количества внутриклеточного тотального Tau или свободного Tau; s) количества конъюгата антитело к Tau-связанный Tau в ISF или CSF; и t) количества внутриклеточного конъюгата антитело к Tau-связанный Tau.

В некоторых случаях способ лечения таупатии у субъекта по изобретению включает также введение по меньшей мере одного дополнительного агента, который также применяется для лечения таупатии.

Настоящее изобретение предусматривает также способ мониторинга прогрессирования таупатии у субъекта, включающий: а) определение первого уровня Tau-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта в первый момент времени; б) определение второго уровня Tau-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта во второй момент времени; и с) сравнение величины второго уровня Tau с величиной первого уровня Tau, при этом указанное определение включает: i) контактирование биологического образца с антителом по любому из п. п. 1, 5, 16 и 21; и ii) количественное определение связывания антитела к Tau-полипептиду, содержащемуся в образце. В некоторых случаях биологический образец является цереброспинальной жидкостью, кровью, плазмой, сывороткой, мочой или слюной. В некоторых случаях количество Tau-полипептида представляет собой количество тотального (общего) Tau-полипептида. В некоторых случаях количество Tau-полипептида является количеством N-концевого фрагмента полноразмерного Tau-полипептида. В некоторых случаях первый момент времени является моментом времени перед началом лечения, и второй момент времени является моментом после начала лечения.

Настоящее изобретение предусматривает способ определения Tau-полипептида в организме живого субъекта *in vivo*, который включает: а) введение субъекту антитела по любому из п. п. 1, 5, 16 и 21; и б) определение степени связывания антитела с Tau-полипептидом в ткани мозга у субъекта с использованием метода визуализации изображения. В некоторых случаях антитело содержит контрастный агент, пригодный для применения при осуществлении метода визуализации. В некоторых случаях метод визуализации представляет собой магнитно-резонансную томографию или позитронно-эмиссионную томографию.

Настоящее изобретение предусматривает *in vitro* способ определения Tau-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта, который включает: а) контактирование биологического образца с антителом, конкурирующим при связывании с эпитопом в пределах N-концевой области Tau с антителом, которое включает: i) участки,

распознающие антиген, гипервариабельные участки (CDRs) лёгкой цепи антитела, изображённого на Фигуре 1В; CDRs тяжёлой цепи антитела, изображённого на Фигуре 1А; или ii) CDRs лёгкой цепи антитела, изображённого на Фигуре 2В; и CDRs тяжёлой цепи антитела, изображённого на Фигуре 2А ; и b) определение степени связывания антитела с Tay-полипептидом, содержащимся в образце. В некоторых случаях биологический образец является цереброспинальной жидкостью, кровью, плазмой, сывороткой, мочой или слюной. В некоторых случаях предполагают наличие таупатии у субъекта, или таупатия диагностирована, или субъект имеет генетическую предрасположенность к возникновению таупатии. В некоторых случаях указанный метод является количественным. В некоторых случаях определённый Tay-полипептид является тотальным Tay-полипептидом. В некоторых случаях определённый Tay-полипептид представляет собой N-концевой фрагмент полноразмерного Tay-полипептида.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

На Фигурах 1А и представлены аминокислотные последовательности антитела IPN001 VH (Фигура 1А) и VL (Фигура 1В). Гипервариабельные участки, участки, распознающие антиген (CDRs), выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

На Фигурах 2А и 2В показаны аминокислотные последовательности антитела IPN002 VH (Фигура 2А) и VL (Фигура 2В). Гипервариабельные участки (CDRs), выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

Фигуры 3А-Д показывают влияние антитела к Tay IPN002 на Tay-опосредованную деполяризацию мембранны в кортикальных нейронах.

Фигуры 4А-С иллюстрируют аффинное выделение Tay-белка из цереброспинальной жидкости (CSF).

На Фигуре 5 показано количественный анализ CSF и кондиционированной среде (СМ) в образцах до и после выделения связанного Tay.

На Фигурах 6А-Д представлены аминокислотные последовательности полноразмерного Tay человека.

На Фигуре 7 отражено определение Tay-фрагментов в кондиционированной среде, в интерстициальной жидкости (ISF) из P301L Tay мышей, и в CSF, полученной от пациентов с PSP и AD.

На Фигурах 8А-Д показана индукция гиперактивности кортикальных нейронов фрагментом внеклеточного Tay (eTay) (Фигуры 8А-С); и снижение eTay-индуцированной гиперактивности нейронов при применении антитела к Tay IPN001.

На Фигуре 9 показаны аминокислотная последовательность варианта 1 VH гуманизированного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На Фигуре 10 показаны аминокислотная последовательность варианта 2 VH гуманизированного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На Фигуре 11 показаны аминокислотная последовательность варианта 3 VH гуманизированного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На Фигуре 12 показаны аминокислотная последовательность варианта 4 VH гуманизированного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На Фигуре 13 показаны аминокислотная последовательность варианта 1 V_k гуманизированного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На Фигуре 14 показаны аминокислотная последовательность варианта 2 V_k гуманизированного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На Фигуре 15 показаны аминокислотная последовательность варианта 3 V_k гуманизированного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На Фигуре 16 показаны аминокислотная последовательность варианта 4 V_k гуманизированного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На Фигуре 17 приведена Таблица 4, которая показывает связывающие свойства вариантов гуманизированного антитела IPN-002 по отношению к eTau-белкам.

На Фигуре 18 приведена Таблица 5, которая показывает связывающие свойства вариантов гуманизированного антитела IPN-002 к Tay-383.

Фигуры 19А и 19В отражают свойства вариантов гуманизированного антитела IPN002. На Фигуре 19А показана степень связывания вариантов гуманизированного антитела IPN-002 с Tay, содержащимся в кондиционированной среде iPSC-CN; в лизатах iPSC-CN; в лизатах мозга при наличии AD; и с Tay- P301L в лизатах коры головного мозга мыши; и в лизатах мозга яванского макака. Фигура 19В показывает ингибирование eTau-индукцированной гиперактивности нейронов при применении вариантов гуманизированного антитела IPN002.

Фигура 20 отражает аминокислотные последовательности фрагментов eTau, выравненные с аминокислотной последовательностью фетального Tay.

На Фигурах 21А-С показана реакция в виде пролиферации на введение гуманизированного антитела к Tay (Фигура 21А), химерного антитела (Фигура 21В) и гуманизированного антитела А33 (Фигура 21С).

На Фигуре 22 показано влияние IPN002 на уровень фосфорилированного Tay *in vivo*.

На Фигуре 23 показано снижение уровня свободного Tay и уровня общего Tay в интерстициальной жидкости (ISF) после лечения с применением антитела IPN002.

На Фигуре 24 показано снижение уровня свободного Tay в цереброспинальной жидкости (CSF) после лечения с применением антитела IPN002.

Фигура 25 отражает снижение eTau-индуцированной гиперактивности нейронов при применении IPN002.

Фигура 26 показывает наличие фрагментов Tay в CSF субъектов с вероятной хронической травматической энцефалопатией.

Figure 27 показывает связывание гуманизированного варианта IPN002 с синтетическими Tay-пептидами при проведении твердофазного метода анализа.

Figure 28 показывает связывание гуманизированного варианта IPN002 с синтетическими Tay-пептидами при проведении жидкофазного метода анализа.

Фигура 29 показывает связывание гуманизированного варианта IPN002 с рекомбинантным Tay и с пептидом PAD.

Фигура 30 показывает конкуренцию небиотинилированных форм синтетических Tay-пептидов и биотинилированных форм синтетических Tay-пептидов при связывании с гуманизированным вариантом антитела IPN002.

Фигура 31 отражает влияние введения контрольного IgG, PHF1 или IPN002 на хватательный рефлекс в мышиной модели P310L.

Фигура 32 отражает влияние введения контрольного IgG, PHF1 или IPN002 на среднюю латентность при проведении теста “прогулка по перекладине” в мышиной модели P310L.

Фигура 33 отражает влияние введения контрольного IgG, PHF1 или IPN002 на уровень свободного Tay (Tay, не связанного с антителом к Tay) в образцах CSF в мышиной модели P310L.

На Фигуре 34 показано ингибирование антителом eTau-индуцированной гипервозбудимости нейронов.

Фигура 35 показывает влияние введения полноразмерного, PHF1-реактивного Tay или eTau1a на *in vitro* гипервозбудимость кортикальных нейронов.

На Фигуре 36 графически показано влияние введения полноразмерного, PHF1-реактивного Tay или eTay1a на *in vitro* гипервозбудимость кортикальных нейронов.

На Фигуре 37 показано влияние введения контрольного IgG, ингибитора BACE или IPN002 на уровни А β 40 (левая панель) или А β 42 (правая панель), секретированных из кортикальных нейронов.

На Фигуре 38 показано влияние введения контрольного IgG, ингибитора BACE или IPN002 на уровни А β 40, секретированного из первичных кортикальных нейронов.

На Фигуре 39 показано влияние введения контрольного IgG, ингибитора BACE или IPN002 на уровни А β 42, секретированного из первичных кортикальных нейронов.

На Фигуре 40 показаны результаты картирования эпитопа гуманизированного варианта антитела IPN002 (hu-IPN002).

На Фигуре 41 представлен анализ определения различных Tay-полипептидов в CSF.

На Фигуре 42 показано связывание в CSF Tay антителами IPN002, PHF1 или поликлонального антитела, которое связывает линейный эпитоп в С-концевой части Tay (линейного эпитопа pAb-Tay).

На Фигуре 43 показаны результаты лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на уровня общего Tay в CSF.

Фигуры 44А-Н отражают влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1, или IPN002 на содержание фосфо-Tay AT8 в различных участках мозга и тканях.

Фигуры 45А-Е отражают влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1, или IPN002 на уровни фосфорилированного Tay в различных участках мозга и тканях.

На Фигуре 46 показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1, или IPN002 на гистологию фосфо-Tay AT8 в задней части мозга.

На Фигуре 47 показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1, или IPN002 на гистологию фосфо-Tay AT100 в задней части мозга.

На Фигурах 48А и 48В показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на уровень белка GFAP в гомогенате гиппокампа и в кортикальном гомогенате.

На Фигурах 49А и 49В показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на уровень белка Iba1 в гомогенате гиппокампа и в кортикальном гомогенате.

На Фигурах 50А и 50В показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на уровень А β 40 гомогенате гиппокампа и в кортикальной фракции S1.

На Фигуре 51 показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на количество мышей, способных к проведению “прогулки по перекладине”.

Фигура 52 показывает связывание hu-IPN002 с различными Tay-пептидами

Фигура 53 показывает связывание различных биотинилированных Tay-пептидов с hu-IPN002.

На Фигурах 54А и 54В схематически показано проведение анализов Tay, не связанного с IPN002 (свободного Tay) (Фигура 54А); и Tay, связанного с IPN002 (связанного Tay) (Фигура 54В).

Фигуры 55А и 55В показывают влияние Tay-полипептидов на уровень Аβ40 (Фигура 55А) и Аβ42 (Фигура 55В) в среде, кондиционированной фетальными нейронами человека (HFNs).

Фигуры 56А и 56В показывают влияние введения антител к Tay на уровень Аβ40 (Фигура 56А) и Аβ42 (Фигура 56В) в среде, кондиционированной HFNs.

Фигуры 57А и 57В показывают влияние введения антител к Tay на уровень Аβ40 (Фигура 57А) и Аβ42 (Фигура 57В) в среде, кондиционированной HFNs.

Фигуры 58А и 58В показывают влияние введения антител к Tay на уровень Аβ40 (Фигура 57А) и Аβ42 (Фигура 57В) в среде, кондиционированной HFNs в течение 5 дн. (d5), 10 дн. (d10), 15 дн. (d15) и 20 дн. (d20).

Фигура 59 показывает схематически области Tay, с которыми связываются различные антитела.

Фигура 60 показывает влияние гуманизированного варианта антитела IPN002 на уровень Аβ в цереброспинальной жидкости нечеловеческих приматов.

На Фигуре 61 приведена аминокислотная последовательность Tay 2N4R, выравненная с eTay4.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термины “антитела” и “иммуноглобулин” включают антитела или иммуноглобулины любого изотипа, фрагменты антител, которые сохраняют способность к специальному связыванию с антигеном, включая, но без ограничения, фрагменты Fab, Fv, scFv и Fd, химерные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, биспецифические антитела и белки слияния, содержащие антигенсвязывающую часть антитела и белок, не являющийся антителом. Антитела могут быть детектируемы меченными, например, радиоизотопом, ферментом, который генерирует детектируемый продукт, флуоресцентным белком и т. п. Антитела могут быть также конъюгированы с другими молекулами, такими как члены пар специфического связывания, например,

биотин (член пары специфического связывания биотин-авидин) и т. п. Антитела также могут быть связаны с твёрдой подложкой, включая, но без ограничения, полистирольные пластины или гранулы, и т. п. Этим термином охвачены также Fab', Fv, F(ab')₂ и/или другие фрагменты антител, которые сохраняют способность к специальному связыванию с антигеном, и моноклональные антитела. Антитело может быть одновалентным или бивалентным.

Термин "гуманизированный иммуноглобулин", используемый в данной заявке, относится к иммуноглобулину, содержащему части иммуноглобулинов различного происхождения, при этом по меньшей мере одна часть включает аминокислотные последовательности человеческого происхождения. Например, гуманизированное антитело может включать части, полученные из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения с требуемой специфичностью, такого как мышиный иммуноглобулин, и последовательностей иммуноглобулина человеческого происхождения (например, химерного иммуноглобулина), соединённые вместе обычными химическими методами (например, методами синтеза) или полученные в виде полипептида с перекрывающимися участками с использованием методов генной инженерии (например, ДНК, кодирующая белковые части химерного антитела, может быть экспрессирована для получения цепи полипептида с перекрывающимися участками). Другим примером гуманизированного иммуноглобулина является иммуноглобулин, содержащий одну или более цепей иммуноглобулина, включающих CDR, полученную из антитела нечеловеческого происхождения, и каркасную область из лёгкой и/или тяжёлой цепей человеческого происхождения (например, CDR-привитые антитела с изменениями в каркасной области или без них). Химерные или CDR-привитые одноцепочечные антитела также охвачены данным термином "гуманизированный иммуноглобулин". См., например, Cabilly et al., патент США № 4,816,567; Cabilly et al., европейский патент № 0,125,023 B1; Boss et al., патент США № 4,816,397; Boss et al., европейский патент № 0,120,694 B1; Neuberger, M. S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., европейский патент № 0,194,276 B1; Winter, патент США № 5,225,539; Winter, европейский патент № 0,239,400 B1; Padlan, E. A. et al., европейская заявка на патент № 0,519,596 A1. См. также Ladner et al., патент США № 4,946,778; Huston, патент США № 5,476,786; и Bird, R. E. et al., Science, 242: 423-426 (1988)), где рассматриваются одноцепочечные антитела.

Например, гуманизированные иммуноглобулины могут быть получены с использованием синтетических и/или рекомбинантных нуклеиновых кислот для получения генов (например, кДНК), кодирующих желательную гуманизированную цепь. Например, последовательности нуклеиновых кислот (например, ДНК), кодирующие

гуманизированные вариабельные участки, могут быть созданы с применением методов мутагенеза с помощью ПЦР для изменения последовательностей ДНК, кодирующих человеческую или гуманизированную цепь, такую как матричная цепь ДНК из ранее гуманизированного вариабельного участка (см., например, Kamman, M., et al., Nucl. Acids Res., 17: 5404 (1989)); Sato, K., et al., Cancer Research, 53: 851-856 (1993); Daugherty, B. L. et al., Nucleic Acids Res., 19(9): 2471-2476 (1991); и Lewis, A. P. and J. S. Crowe, Gene, 101: 297-302 (1991)). Используя эти или другие подходящие методы, можно легко получить варианты антитела. Например, клонированные вариабельные участки могут быть мутагенезированы, и могут быть выбраны последовательности, кодирующие варианты с желательной специфичностью (например, из библиотеки фагов; см. например, Krebber et al., патент США № 5,514,548; Hoogenboom et al., WO 93/06213, опубликованные 01 апреля 1993 г.).

"Фрагменты антител" включают часть интактного антитела, например, антигенсвязывающий или вариабельный участок интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела (Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); одноцепочечные молекулы антитела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Расщепление антител папаином приводит к получению двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых фрагментами "Fab", каждый из которых содержит антигенсвязывающий сайт, и остаточного фрагмента "Fc", обозначение которого отражает способность к лёгкой кристаллизации. Обработка пепсином приводит к получению фрагмента F(ab')₂, который содержит два антигенсвязывающих сайта и всё ещё способен к сшивке антигена.

"Fv" является минимальным фрагментом антитела, который содержит полный антиген-распознающий и антигенсвязывающий сайт. Этот участок состоит из димера вариабельного домена одной тяжёлой и одной лёгкой цепей в тесной нековалентной связи. Именно в этой конфигурации три CDRS каждого вариабельного домена взаимодействуют для определения антиген-связывающего сайта на поверхности димера V_H-V_L. Шесть CDRS вместе придают антиген-связывающую специфичность антителу. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDRS специфические к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя с более низкой аффинностью, чем весь сайт связывания.

Фрагмент "Fab" также содержит константный домен лёгкой цепи и первый константный домен (CH₁) тяжёлой цепи. Фрагменты Fab отличаются от фрагментов Fab' добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH₁ тяжёлой цепи,

включающего один или более остатков цистеина из шарнирной области антитела. Fab'-SH обозначает в данной заявке Fab', в котором остаток (-ки) цистеина константных доменов содержат свободную тиольную группу. Фрагменты F(ab')₂ антитела первоначально были получены в виде пар фрагментов Fab', которые содержат остатки цистеина шарнирной области между ними. Другие методы химического связывания фрагментов антитела также известны.

"Лёгкие цепи" антител (иммуноглобулинов) любых позвоночных животных могут быть одного из двух чётко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжёлых цепей иммуноглобулины могут быть отнесены к различным классам. Имеются пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и несколько из них могут быть далее подразделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2.

"Одноцепочечные Fv" или фрагменты "sFv" антитела включают V_H и V_L домены антитела, причём эти домены находятся в одной цепи полипептида. Согласно некоторым вариантам полипептид Fv содержит также полипептидный линкер между V_H и V_L доменами который позволяет sFv образовать желаемую структуру для связывания антигена. Обзор sFv можно найти в *Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)*.

Термин "диатела" относится к маленьким фрагментам антитела с двумя антиген-связывающими сайтами, эти фрагменты включают вариабельный домен тяжёлой цепи (V_H), соединённый с вариабельным доменом лёгкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H-V_L). При использовании линкера, который является слишком коротким для спаривания двух доменов в той же цепи, эти домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антиген-связывающих сайта. Более подробно диатела описаны, например, в EP 404,097; WO 93/11161; и в публикации Hollinger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.

Используемый в данной заявке термин "аффинность" относится к константе равновесия при обратимом связывании двух агентов (например, антитела и антигена) и выражается как константа диссоциации (K_d). Аффинность может быть по меньшей мере в один раз больше, по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере в 3 раза больше, по меньшей мере в 4 раза больше, по меньшей мере в 5 раз больше, по меньшей мере в 6 раз больше, по меньшей мере в 7 раз больше, по меньшей мере в 8 раз больше, по меньшей

мере в 9 раз больше, по меньшей мере в 10 раз больше, по меньшей мере в 20 раз больше, по меньшей мере в 30 раз больше, по меньшей мере в 40 раз больше, по меньшей мере в 50 раз больше, по меньшей мере в 60 раз больше, по меньшей мере в 70 раз больше, по меньшей мере в 80 раз больше, по меньшей мере в 90 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше или по меньшей мере в 1000 раз больше, или более, чем аффинность антитела к несвязанным аминокислотным последовательностям. Аффинность антитела к белку-мишени может быть, например, от примерно 100 наномолей (нМ) до примерно 0.1 нМ, от примерно 100 нМ до примерно 1 пикомолей (пМ) или от примерно 100 нМ до примерно 1 фемтомолей (фМ) или более. Используемый в данной заявке термин “авидность” относится к сопротивлению комплекса двух или более агентов к диссоциации после разведения. Термины “иммунореактивный” и “предпочтительно связывает” используются в данной заявке как взаимозаменяемые по отношению к антителам и/или антиген-связывающим фрагментам.

Термин “связывание” относится к прямой ассоциации между двумя молекулами, обусловленной, например, ковалентным, электростатическим, гидрофобным и ионным взаимодействием и/или взаимодействием с образованием водородных связей, включая такие взаимодействия, как протекающие с образованием солевых мостиков и водяных мостиков. Антитело к Tay по изобретению специфически связывает эпитоп в пределах Tay-полипептида. Неспецифическое связывание относится к связыванию с аффинностью менее примерно 10^{-7} М, например, к связыванию с аффинностью 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М и т. д.

Используемый в данной заявке термин “CDR” или “гипервариабельные участок (участок, распознающий антиген)”, означает антиген с неперекрывающимися эпитопами, объединяющий сайты в вариабельном участке и тяжёлой, и лёгкой цепей полипептилов. CDRs были описаны в публикациях Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991); by Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); и MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), где определения включают перекрывание или наборы аминокислотных остатков по сравнению друг с другом. Тем не менее, использование любого определения по отношению к CDR антитела или привитых антител, или их фрагментов охвачено объёмом термина, определение которого дано выше и применяется в данной заявке. Аминокислотные остатки, которые входят в CDRs, определение которых приведено в каждой из указанных ссылок, содержится в Таблице 1 в виде сравнения.

Таблица 1: Определения CDR

	KKabat¹ послед.)²	(перечень	CChothia³	MMacCallum⁴
V _H CDR1	31-35 (31-35)		6-32	0-35
V _H CDR2	0-65 (50-66)		3-55	7-58
V _H CDR3	5-102 (99-106)		6-101	3-101
V _L CDR1	4-34 (24-39)		6-32	0-36
V _L CDR2	0-56 (55-61)		0-52	6-55
V _L CDR3	9-97 (94-102)		1-96	9-96

¹Нумерация остатков согласно номенклатуре по Kabat et al., *supra*

²Соответствующие остатки согласно номенклатуре, приведённой в перечне последовательностей

³Нумерация остатков согласно номенклатуре по Chothia et al., *supra*

⁴Нумерация остатков согласно номенклатуре по MacCallum et al., *supra*

Используемый в данной заявке термин “каркасная область” при использовании в отношении вариабельного участка антитела означает все аминокислотные остатки вне областей CDR в пределах вариабельного участка антитела. Каркасная область вариабельного участка обычно представляет собой прерывистую аминокислотную последовательность длиной между примерно 100 и 120 аминокислотами, но относится только к аминокислотам, расположенным вне CDRs. Применяемый в данной заявке термин “каркасная область” означает каждый домен каркасной области, который отделён при помощи CDRs.

Термин “выделенное” антитело относится к антителу, которое было идентифицировано и отделено и/или было выделено из компонента его природного окружения. Загрязняющими компонентами его природного окружения являются материалы, которые будут принимать участие при диагностическом или терапевтическом использовании антитела, и которые могут включать ферменты, гормоны и другие белковые и небелковые вещества. В соответствии с некоторыми вариантами антитело очищают до степени (1), превышающей 90 %, превышающей 95 % или превышающей 98 % от веса антитела, при определении методом Лоури, например, превышающей 99 % по весу, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путём использования секвенатора с вращающимся стаканом или (3) до гомогенности с помощью электрофореза на

полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с применением красителя Coomassie голубого или серебряного красителя. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент из природного окружения антитела будет отсутствовать. В некоторых случаях выделенное антитело получают при применении по меньшей мере одной стадии очистки.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок", используемые как взаимозаменяемые, относятся к полимерной форме аминокислот с любой длиной, которые могут включать генетически кодированные или не генетически кодированные аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты и полипептиды, содержащие модифицированные пептидные основные цепи. Этот термин охватывает слитые белки, включая, но без ограничения, слитые белки с гетерологичной аминокислотной последовательностью, слитые белки с гетерологичной и гомологичной лидерными последовательностями, с N-концевыми метиониновыми остатками или без них; иммунологически меченные белки и т. п.

Применяемые в данной заявке термины "лечение", "лечащий" и т. п. относятся к получению желательного фармакологического и/или физиологического эффекта. Такой эффект может быть профилактическим в случае полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим в случае частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного действия, приписываемого заболеванию. Термин "лечение", используемый в данной заявке, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, особенно у человека, и включает: (a) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к этому заболеванию, но это заболевание ещё не было диагностировано; (b) ингибирование заболевания, то есть, остановку его развития; и (c) облегчение заболевания, то есть, появление регрессии заболевания.

Термины "индивидуум", "субъект", "хозяин" и "пациент," используемые в данной заявке как взаимозаменяемые, относятся к млекопитающему, включая, но без ограничения, грызунов (крыс, мышей), нечеловеческих приматов, людей, собак, кошек, копытных животных (например, лошадей, коров, быков, овец, свиней, коз) и т. п.

Термин "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" относится к количеству антитела к Tay, которое после введения млекопитающему или другому субъекту для лечения заболевания является достаточным для эффективного лечения этого заболевания. "Терапевтически эффективное количество" будет меняться в

зависимости от вида антитела к Тау, вида заболевания и степени его серьёзности и возраста, веса и т. д. субъекта, лечение которого проводится.

Термин “биологический образец” охватывает различные виды образцов, отобранные у субъекта, и может быть использован при проведении диагностики или мониторинга. Это определение охватывает кровь и другие жидкые образцы биологического происхождения, образцы твёрдых тканей, такие как образцы при биопсии или культуры тканей или клеток, полученных из них, и их потомство. Этот термин включает также образцы, которые были обработаны любым путём после их получения, например, были обработаны реагентами, солюбилизированы или обогащены некоторыми компонентами, такими как полинуклеотиды. Термин “биологический образец” охватывает клинический образец и включает также клетки в культуре, клеточные супернатанты, клеточные лизаты, сыворотку, плазму, биологическую жидкость и образцы тканей. Термин “биологический образец” включает мочу, слону, цереброспинальную жидкость, фракции крови, такие как плазма и сыворотка и т. п

Перед дальнейшим описанием данного изобретения следует отметить, что это изобретение не ограничивается конкретными описанными вариантами, так как, конечно, может быть изменено. Следует также иметь в виду, что терминология, использованная в данной заявке, служит только для цели описания конкретных вариантов, и не является ограничивающей, так как объём настоящего изобретения ограничен только формулой изобретения.

В тех случаях, когда приведён интервал величин, следует иметь в виду, что настоящее изобретение охватывает каждую величину, до десятой доли величины низшего предела, если из контекста не следует иное, между верхним и нижним пределами и любую другую указанную величину или величину, находящуюся в этом интервале. Верхний и нижний пределы этих меньших величин могут быть независимо включены в меньший интервал и также охвачены данным изобретением, с учётом специально исключённого (если это сделано) интервала в заявлном интервале. Когда заявленный интервал включает одно или два ограничения, пределы, исключающие одно или оба ограничения, также входят в объём изобретения.

Если иное не оговаривается, все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют то же значение, которое понятно среднему специалисту в области, к которой относится данное изобретение. Хотя любые методы и материалы, похожие или эквивалентные описанным в данной заявке методам и материалам, также могут быть использованы в практике или тестировании данного изобретения, здесь описаны предпочтительные методы и материалы. Все публикации, упомянутые в данной заявке,

включены в неё посредством отсылки и описывают способы и/или материалы, которые описаны в этих публикациях.

Необходимо отметить, что используемые в описании и в формуле изобретения формы в единственном числе включают и множественное число, если не оговорено иное. Так, например, ссылка на “гуманизированное антитело к Tay” относится к множеству таких антител, и ссылка на “таупатию” относится к одному или более видов таупатий и их эквивалентам, известным специалистам в данной области, и т. д. Следует также заметить, что формула изобретения должна быть составлена таким образом, чтобы исключить любой необязательный элемент. Это утверждение должно служить основой для применения такой исключающей терминологии как “исключительно”, “только” и т. п. в связи с описанием элементов формулы изобретения или применением “отрицательного” ограничения.

Следует также отметить, что некоторые признаки данного изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных элементов, могут быть также использованы в комбинации с одним элементом. И наоборот, различные признаки настоящего изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта, могут быть предусмотрены в отдельности или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов, относящиеся к данному изобретению, охвачены данным изобретением и описаны здесь, как если бы каждая комбинация индивидуально и ясно была раскрыта. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов и их элементы также охвачены настоящим изобретением и раскрыты таким образом, как если бы каждая такая подкомбинация индивидуально и ясно была раскрыта.

Все публикации, обсуждавшиеся в данном описании, приведены только для их раскрытия до даты подачи данной заявки. Ничто, содержащееся в данной заявке, не должно толковаться как допущение, что настоящее изобретение не даёт право относить к более ранней дате такую публикацию благодаря известному изобретению. Кроме того, даты публикации, указанные в настоящем описании, могут отличаться от действительных дат публикации, что может нуждаться в независимом подтверждении.

СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предусматривает способы лечения таупатии, включающие введение антитела к Tay. Данное изобретение предусматривает также антитела к Tay и композиции, их содержащие, для использования при осуществлении таких способов.

Данное изобретение относится также к способам *in vitro* и *in vivo* определения, использующим антитело к Tay, описанное в настоящей заявке.

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ТАУПАТИИ

Настоящее изобретение предусматривает способы лечения таупатии. Эти способы обычно включают введение эффективного количества антитела к Tay по данному изобретению субъекту, который нуждается в этом. В некоторых случаях введение субъекту антитела к Tay приводит к снижению уровня патологического Tay-полипептида в клетке, в ткани или жидкости субъекта и к лечению таупатии.

В некоторых случаях способы согласно данному изобретению включают снижение содержания бета-амилоида ($\text{A}\beta$) (например, $\text{A}\beta 40$ и/или $\text{A}\beta 42$) в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) путём введения антитела к Tay, при этом эпигоп, связанный антителом, включает аминокислотные остатки в пределах аминокислот 1-158 в Tay, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает Tay, при этом эпигоп, связанный антителом, включает аминокислотные остатки в пределах аминокислот 2-18 в Tay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает Tay, при этом эпигоп, связанный антителом, представляет собой линейный эпигоп, и эпигоп, связанный антителом, включает аминокислотные остатки в пределах аминокислот 2-68 в Tay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay4-полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:48 (eTay; показана на Фигуре 61) по меньше мере на 95 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % или на 100 %. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает линейный эпигоп в Tay-полипептиде, при этом эпигоп находится в пределах аминокислот 2-68 в Tay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает линейный эпигоп в Tay-полипептиде, при этом эпигоп находится в пределах аминокислот 15-24 в Tay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает Tay, при этом эпигоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 7-13 в Tay, например, аминокислоты EFEV ред (SEQ ID NO:87). В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает Tay, при этом эпигоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 25-30 в Tay, например, аминокислоты DQGGYT (SEQ ID NO:88). В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится,

специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 28-126 в Tay, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 150-158 в Tay, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 19-46 в Tay, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61.

В некоторых случаях способ согласно данному изобретению включает снижение бета-амилоида ($\text{A}\beta$) (например, $\text{A}\beta 40$ и/или $\text{A}\beta 42$) в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) путём введения антитела, которое специфически связывает внеклеточный Tay (eTay), при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 1-158 в eTay, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61.

В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 2-18 в eTay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный антителом, представляет собой линейный эпитоп и содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 2-68 в eTay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay-полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:48 (eTay; показана на Фигуре 61) по меньше мере на 95 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % или на 100 %. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в eTay, при этом эпитоп находится в пределах аминокислот 2-68 в eTay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в eTay-полипептиде, при этом эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 в eTay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный

антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 7-13 в eTay, например, аминокислоты EFEVMED (SEQ ID NO:87). В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 25-30 в eTay, например, аминокислоты DQGGYT (SEQ ID NO:88). В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 28-126 в eTay, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 150-158 в eTay, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 19-46 в eTay, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61.

Например, согласно некоторым вариантам способ по изобретению может включать введение субъекту, который нуждается в этом, эффективного количества выделенного гуманизированного моноклонального антитела, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Tay-полипептида. Согласно некоторым вариантам антитело содержится в фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым эксципиентом, например, фармацевтически приемлемым эксципиентом, который подходит для введения человеку. Например, согласно некоторым вариантам способ по изобретению может включать введение субъекту, который нуждается в этом, эффективного количества выделенного антитела, которое содержит каркасную область гуманизированной лёгкой цепи и каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи, при этом выделенное антитело конкурирует при связывании с эпитопом в N-концевом участке Tay-полипептида с антителом, которое содержит: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и б) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную

SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. Согласно некоторым вариантам антитело содержится в фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым эксципиентом, например, фармацевтически приемлемым эксципиентом, который подходит для введения человеку.

Например, согласно некоторым вариантам способ по изобретению может включать введение субъекту, который нуждается в этом, эффективного количества выделенного антитела, при этом антитело представляет собой фрагменты Fv, scFv, Fab, F(ab')2 или Fab', и антитело при связывании с эпитопом в N-концевом участке Тау-полипептида конкурирует с антителом, которое содержит: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; and (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. Согласно некоторым вариантам антитело содержится в фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым эксципиентом, например, фармацевтически приемлемым эксципиентом, который подходит для введения человеку.

Например, согласно некоторым вариантам способ по изобретению может включать введение субъекту, который нуждается в этом, эффективного количества выделенного антитела, при этом выделенное антитело содержит константную область лёгкой цепи человека и константную область тяжёлой цепи человека и выделенное антитело при связывании эпитопом в N-концевой области Тау-полипептида конкурирует с антителом, которое включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок VH CDR1, содержащий

аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. Согласно некоторым вариантам антитело содержится в фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым эксципиентом, например, фармацевтически приемлемым эксципиентом, который подходит для введения человеку.

Антитело к Tay согласно настоящему изобретению связывает внеклеточный Tay. Термин “внеклеточный Tay” (“eTay”), используемый в данной заявке, охватывает любой Tay-полипептид, который может быть детектирован в цереброспинальной жидкости (CSF) или интерстициальной жидкости (ISF). Согласно некоторым вариантам eTay представляет собой полипептид длиной в 175 аминокислот и содержит аминокислоты 2-176 полноразмерного Tay; например, согласно некоторым вариантам eTay является полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:45. Согласно некоторым вариантам eTay представляет собой полипептид длиной в 171 аминокислоту и содержит аминокислоты 2-172 (SEQ ID NO:44) полноразмерного Tay; например, согласно некоторым вариантам eTay является полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:44. Согласно некоторым вариантам eTay представляет собой полипептид eTay2 и содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:46. Согласно некоторым вариантам eTay представляет собой полипептид eTay3 и содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:47. Согласно некоторым вариантам eTay представляет собой полипептид eTay4 и содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:48.

В некоторых случаях полипептид eTay имеет длину от примерно 50 аминокислот до примерно 175 аминокислот, например, от примерно 50 аминокислот (аа) до примерно 75 аа, от примерно 75 аа до примерно 100 аа, от примерно 100 аа до примерно 125 аа, от примерно 125 аа до примерно 150 аа или от примерно 150 аа до примерно 175 аа; и может содержать от примерно 50 до примерно 75, от примерно 75 до примерно 100, от примерно 100 до примерно 125, от примерно 125 до примерно 150 или от примерно 150 до примерно 175 перекрывающихся аминокислот из аминокислот 2-176 полноразмерного Tay. Примеры полипептидов eTay представлены на Фигуре 20.

Как описано более подробно ниже, антитело к Tay по данному изобретению специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный антителом, является линейным и содержит остатки аминокислот в пределах аминоконцевого (N-концевого участка) Tay,

например, в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 1-18 в Tay, в пределах аминокислот от 9 до 18 Tay, в пределах аминокислот 13-24 Tay, в пределах аминокислот 15-44 Tay или в пределах аминокислот 15-24 Tay. Аминокислотные последовательности изоформ человеческого Tay представлены на Фигурах 6А-Д. Аминокислотами 1-18 в Tay являются: MAEPRQEFEVMDHAGTY; SEQ ID NO:53). См., например, Garcia-Sierra et al. (2003) *J. Alzheimer's Disease* 5:65; и Horowitz et al. (2004) *J. Neurosci.* 24:7895. Аминокислотами 15-24 в Tay являются: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51).

Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по данному изобретению специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный антителом, представляет собой линейный эпитоп и содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 13-24 Tay или в пределах аминокислот 15-24 Tay. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 13-24 Tay или в пределах аминокислот 15-24 Tay, при этом этот эпитоп не включает фосфорилированную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 13-24 Tay или в пределах аминокислот 15-24 Tay, при этом этот эпитоп включает фосфорилированную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 13-24 Tay или в пределах аминокислот 15-24 Tay, при этом этот эпитоп не включает нитрованную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 13-24 Tay или в пределах аминокислот 15-24 Tay, при этом этот эпитоп включает нитрованную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 13-24 Tay или в пределах аминокислот 15-24 Tay, причём эпитоп содержит нитрованную аминокислоту и не содержит фосфорилированную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 13-24 Tay или в пределах аминокислот 15-24 Tay или в

пределах аминокислот 15-24 Tay, причём эпитоп содержит фосфорилированную аминокислоту и не содержит нитрованную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 13-24 Tay или в пределах аминокислот 15-24 Tay, причём эпитоп содержит фосфорилированную аминокислоту и содержит нитрованную аминокислоту.

Например, согласно некоторым вариантам антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) Tay. В некоторых случаях согласно некоторым вариантам гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) в Tay.

В некоторых случаях согласно некоторым вариантам гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) в Tay, при этом эпитоп не включает фосфорилированную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) в Tay, при этом эпитоп включает фосфорилированную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) в Tay, при этом эпитоп не включает нитрованную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) в Tay, при этом эпитоп включает нитрованную аминокислоту и не включает фосфорилированную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) в Tay, при этом эпитоп не включает нитрованную аминокислоту и включает фосфорилированную

аминокислоту. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51) в Tay, при этом эпитоп включает и нитрованную аминокислоту, и фосфорилированную аминокислоту.

В некоторых случаях способ согласно изобретению, предназначенный для лечения таупатии, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей: а) антитело к Tay, включающее: i) один, два или три гипервариабельных участка (CDRs) лёгкой цепи антитела, показанного на Фигуре 1, распознающих антиген; и один, два или три гипервариабельных участка (CDRs) тяжёлой цепи антитела, показанного на Фигуре 1, распознающих антиген; или ii) один, два или три гипервариабельных участка (CDRs) лёгкой цепи антитела, показанного на Фигуре 2, распознающих антиген; один, два или три гипервариабельных участка (CDRs) тяжёлой цепи антитела, показанного на Фигуре 2, распознающих антиген; и b) фармацевтически приемлемый эксципиент, подходящий для введения человеку.

В некоторых случаях способ лечения таупатии согласно данному изобретению включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей: а) антитело, которое специфически связывает эпитоп в Тау-полипептиде человека, при этом такое антитело при связывании с эпитопом конкурирует с антителом, которое включает: i) гипервариабельные участки (CDRs) лёгкой цепи антитела, показанного на Фигуре 1B; и CDRs тяжёлой цепи антитела, показанного на Фигуре 1A; или ii) CDRs лёгкой цепи антитела, показанного на Фигуре 2B; и CDRs тяжёлой цепи антитела, показанного на Фигуре 2A; и b) фармацевтически приемлемый эксципиент, подходящий для введения человеку.

В некоторых случаях способ лечения таупатии согласно данному изобретению включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей: а) антитело, которое конкурирует с гуманизированным IPN002 (hu-IPN002) при связывании с эпитопом в Tay, который распознаётся hu-IPN002 (например, линейным эпитопом в N-концевой части Tay, например, в пределах аминокислот 1-25 в Tay, в пределах аминокислот 1-18 в Tay, в пределах аминокислот от 9 до 18 в Tay, в пределах аминокислот 15-44 в Tay, в пределах аминокислот 13-24 в Tay или в пределах аминокислот 15-24 в Tay); и b) фармацевтически приемлемый эксципиент, подходящий для введения человеку.

IPN001 (обозначаемый в данной заявке “IPN1” или “IPN-1”) и IPN002 (обозначаемый в данной заявке “IPN2” или “IPN-2”) специфически связывают Tay. Эпитоп, связываемый IPN001, является линейным эпитопом и содержит остатки

аминокислот в переделах аминоконцевого (N-концевого) участка Tay, например, в пределах аминокислот 1-25 Tay.

В некоторых случаях антитело к Tay согласно данному изобретению, которое пригодно для применения при осуществлении способа лечения таупатии, включает: а) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN001; и ii) каркасную область гуманизированной лёгкой цепи; и b) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_H CDRs антитела IPN001; и ii) каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи; где V_H и V_L CDRs определены согласно номенклатуре по Кабату (см., например, Таблицу 1, выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991)).

В некоторых случаях антитело к Tay согласно данному изобретению, которое пригодно для применения при осуществлении способа лечения таупатии, включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN001; и ii) каркасную область гуманизированной лёгкой цепи; b) область тяжёлой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_H CDRs антитела IPN001; и ii) каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи. где V_H и V_L CDRs определены согласно номенклатуре по Чотиа (Chothia) (см., например, Таблицу 1 выше; и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

В других случаях антитело к Tay согласно данному изобретению, которое пригодно для применения при осуществлении способа лечения таупатии, включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN002; и ii) каркасную область гуманизированной лёгкой цепи; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_H CDRs антитела IPN002; и ii) каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи. где V_H и V_L CDRs определены согласно номенклатуре по системе Kabat (см., например, Таблицу 1, выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991)).

В других случаях антитело к Tay по изобретению (например, антитело по изобретению, которое специфически связывает эпигоп в Tay-полипептиде, причём эпигоп находится в аминоконцевой (N-концевой) части Tay, например, в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 1-18 of Tau, в пределах аминокислот от 9 до 18 Tay, в пределах аминокислот 15-44 Tay, в пределах аминокислот 13-24 Tay или в пределах аминокислот 15-24 Tay, включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN002; и ii) каркасную область гуманизированной лёгкой цепи; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_H CDRs

антитела IPN002; и ii) каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи. где V_H и V_L CDRs определены согласно номенклатуре по системе Chothia (см., например, Таблицу 1, выше; и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

В некоторых случаях настоящего изобретения способ лечения таупатии включает введение субъекту, который нуждается в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: а) антитело, которое специфически связывает линейный эпитетоп в аминоконцевой (N-концевой) части Tay, например, в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 1-18 of Tay, в пределах аминокислот от 9 до 18 Tay (при этом аминокислоты 1-18 Tay представляют собой: MAEPRQEFEVMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Tay, в пределах аминокислот 13-24 Tay или в пределах аминокислот 15-24 Tay (при этом аминокислоты 15-24 Tay представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)), причём такое антитело включает: (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; (iv) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (v) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (vi) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12; и б) фармацевтически приемлемый эксципиент, подходящий для введения человеку.

Аминокислотные последовательности V_H и V_L антитела IPN001 представлены на Фигурах 1A и 1B. CDRs (как определено согласно номенклатуре по Kabat) выделены жирным шрифтом и подчёркнуты. Аминокислотные последовательности V_H и V_L антитела IPN002 представлены на Фигурах 2A и 2B. CDRs (определенные согласно номенклатуре по Kabat) выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

SEQ ID NOs:1-12 являются следующими:

RSSQTILHSNGNTYLE (SEQ ID NO:1);

KVSKRFS (SEQ ID NO:2);

FQ GSL VPWA (SEQ ID NO:3);

SY GMS (SEQ ID NO:4);

TISSSGSRTYFPDSVKKG (SEQ ID NO:5);

TWDGAMDY (SEQ ID NO:6);

KSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:7);

KVSNRFS (SEQ ID NO:8);

FQGSLVPWA (SEQ ID NO:9);
KYGMS (SEQ ID NO:10);
TISSSGSRTYYPDSVKG (SEQ ID NO:11);
SWDGAMDY (SEQ ID NO:12).

В некоторых случаях антитело включает каркасную область гуманизированной лёгкой цепи и/или каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи. Гуманизированные антитела к Tau описаны более подробно ниже.

Таупатия представляет собой заболевание, характеризующееся аномальным уровнем Tau в клетке, в ткани или в жидкости в организме субъекта. В некоторых случаях таупатия характеризуется повышенными (превышающими норму) уровнями Tau или Tau-полипептидов и/или патологических форм Tau в клетке, в ткани или в жидкости. Например, в некоторых случаях таупатия характеризуется наличием повышенных уровней Tau или Tau-полипептидов и/или патологических форм Tau в ткани мозга и/или в цереброспинальной жидкости (ликворе). “Превышающий норму” уровень Tau в клетке, в ткани или в жидкости в организме показывает, что уровень Tau в ткани или в жидкости выше, чем нормальный, контролируемый уровень, например, выше, чем нормальный, контролируемый уровень у субъекта или популяции субъектов одной возрастной группы. См., например, Blomberg et al. (2001) “Cerebrospinal fluid tau levels increase with age in healthy individuals” *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 12:127. В некоторых случаях субъект, больной таупатией, проявляет один или более дополнительных симптомов таупатии (например, ухудшение когнитивных способностей).

В других случаях таупатия характеризуется наличием уровня Tau в клетке, в ткани или в жидкости, который ниже нормального. Уровень Tau “ниже нормального” в ткани или в жидкости показывает, что уровень Tau в клетке, в ткани или в жидкости ниже, чем нормальный, контролируемый уровень у субъекта или популяции субъектов одной возрастной группы

Болезнь Альцгеймера или некоторые формы лобно-височной деменции (болезнь Пика, спорадические случаи лобно-височной деменции и лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с нарушением в хромосоме 17) являются наиболее распространёнными формами таупатии. Настоящее изобретение предусматривает способ лечения, описанный выше, при этом таупатия представляет собой болезнь Пика, спорадические случаи лобно-височной деменции и лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с нарушением в хромосоме 17. Другие виды таупатии включают, но без ограничения, прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортико базальную дегенерацию (CBD) и подострый склерозирующий панэнцефалит.

Нейродегенеративные таупатии включают болезнь Альцгеймера, комплекс боковой амиотрофический склероз/паркинсонизм-деменция, деменцию с аргирофильтальными гранулами, амилоидную ангиопатию британского типа, церебральную амилоидную ангиопатию, кортико базальную дегенерацию, болезнь Крейцфельда-Якоба, деменцию боксёров, диффузные нейрофибрillaryные узлы с кальцификацией, синдром Дауна, лобно-височную деменцию (FTD), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с нарушением в хромосоме 17, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезнь Галлевордена-Шпатца, миозит с включёнными тельцами, множественную системную атрофию, миотоническую дистрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, болезнь двигательного нейрона с нейрофибрillaryными клубками не гуамского происхождения, болезнь Пика, постэнцефалический паркинсонизм, церебральную амилоидную ангиопатию с переносом прионов, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию только с нейрофибрillaryными сплетениями (Tangle only dementia), мультиинфарктную деменцию, ишемический инсульт, хроническую травматическую энцефалопатию (CTE), травматическое повреждение мозга (TBI) и инсульт.

Настоящее изобретение предусматривает также способы лечения синуклеинопатий, например, болезни Паркинсона (PD); деменции с тельцами Леви (DLB); множественной системной атрофии (MSA) и т. д. Например, применяя способ по изобретению, можно осуществлять лечение субъекта, больного PD с деменцией (PDD).

Согласно одному из вариантов антитело к Tau по данному изобретению предотвращает или задерживает начало возникновения по меньшей мере одного симптома нейродегенеративной таупатии у субъекта. Согласно одному из вариантов антитело к Tau по изобретению ослабляет или устраняет по меньшей мере один симптом нейродегенеративной таупатии у субъекта. Симптомом может быть образование одного или более отложений патологического Tau; внеклеточного растворимого Tau и/или фрагментов Tau; отложения гиперfosфорилированного Tau; отложения нерастворимого Tau; нейрофибрillaryных узлов; нейрофибрillaryных волокон; появление агрегатов фосфо-Tau перед образованием узлов; нейрофибрillaryных узлов внутри нейронов; гиперактивность нейронов и появление нейрофибрillaryных узлов вне нейронов в головном мозге или в спинном мозге субъекта. Такой симптом может быть неврологическим, например, ухудшенной когнитивной способностью, ухудшением памяти, потерей двигательной (моторной) функции и т. д. В некоторых случаях антитело к Tau по изобретению может улучшать когнитивные способности. В некоторых случаях

антитело к Tay по изобретению может снижать скорость ухудшения когнитивных способностей. В некоторых случаях антитело к Tay по изобретению может улучшать двигательную функцию. В некоторых случаях антитело к Tay по изобретению может снижать скорость ухудшения двигательной функции.

Симптомом может также быть уровень Tay-полипептида в CSF субъекта. Например, согласно некоторым вариантам антитело к Tay по изобретению при его введении субъекту с таупатией в одной или более дозах в случае монотерапии или в случае комбинированной терапии снижает уровень Tay-полипептида в CSF субъекта по меньше мере на примерно 10 %, по меньшей мере на 15 %, по меньшей мере на примерно 20 %, по меньшей мере на примерно 25 %, по меньшей мере на примерно 30 %, по меньшей мере на примерно 40 %, по меньшей мере на примерно 50 % или более чем на 50 % по сравнению с уровнем Tay-полипептида в CSF субъекта до начала лечения антителом к Tay. Введение субъекту антитела к Tay по изобретению может привести к одному или более результатам из: уменьшения количества свободного внеклеточного Tay в тканях мозга; уменьшения передачи Tay (например, фрагментов Tay) от клетки к клетке (например, передачи от нейрона к нейрону); уменьшения количества агрегатов Tay (например, внутриклеточных (в том числе, внутринейронных) агрегатов Tay); уменьшения количества нейрофибриллярных узлов в тканях мозга; уменьшения уровня микроглиальной активации и/или активации астроцитов; уменьшения количества фосфорилированного Tay; уменьшения количества гиперфосфорилированного Tay; уменьшения количества общего Tay (например, общего внутриклеточного Tay и/или общего внеклеточного Tay); уменьшения количества свободного Tay (например, Tay, который не связан с антителом к Tay субъекта); уменьшения гиперактивности нейронов и уменьшения количества N-концевых фрагментов Tay. “Общий Tay” может включать суммарное количество общего полноразмерного Tay любой изоформы и любых N-концевых фрагментов Tay, которые содержатся и которые выявляют эпитоп, распознаваемый антителом к Tay по изобретению. Аминокислотные последовательности человеческого полноразмерного Tay представлены на Фигурах 6А-Д. Снижение уровня фосфорилированного Tay может быть определено при помощи любого известного метода, например, иммунологического метода с использованием антитела к фосфорилированному Tay.

Введение антитела к Tay по изобретению субъекту может привести к изменению одного или более показателей: а) количества свободного внеклеточного Tay в ткани мозга; б) количества свободного внеклеточного Tay в интерстициальной жидкости (ISF); в) количества свободного внеклеточного Tay в цереброспинальной жидкости (CSF); г)

передачи Tay от нейрона к нейрону; е) количества агрегатов Tay внутри нейронов; f) степени микроглиальной активации и/или активации астроцитов; г) количества фосфорилированного или гиперфосфорилированного Tay; h) количества общего Tay или свободного Tay в ISF или CSF; i) количества внутриклеточных N-концевых фрагментов Tay; j) гиперактивности нейронов; k) количества А β 40 и/или А β 42 в CSF; l) объёма бляшек А β ; m) секреции А β 40 и/или А β 42 из нейрона; n) активности промотора предшественника амилоида (APP); о) уровня мРНК APP и/или уровня белка; р) активности бета-секретазы и/или гамма-секретазы; q) состояния активации А β -индуцированного сигнального пути; r) количества общего внутриклеточного Tay или свободного Tay; s) количества конъюгата антитело к Tay-связанный Tay в ISF или CSF и т) количества внутриклеточного конъюгата антитело к Tay-связанный Tay.

Введение антитела к Tay по изобретению субъекту в некоторых случаях может улучшить познавательные способности субъекта, по меньшей мере снизить скорость ухудшения познавательной функции у субъекта.

В некоторых случаях введение антитела к Tay по изобретению субъекту уменьшает количество свободного внеклеточного Tay-полипептида (например, количество свободного внеклеточного Tay-полипептида в ткани мозга) по меньшей мере примерно на 10 %, по меньшей мере примерно на 20 %, по меньшей мере примерно на 25 %, по меньшей мере примерно на 50 % или более, чем на 50 % по сравнению с количеством свободного внеклеточного Tay-полипептида у субъекта перед введением антитела к Tay.

В некоторых случаях введение антитела к Tay по изобретению субъекту уменьшает передачу Tay-полипептида (например, патологического Tay-полипептида) от клетки к клетке (например, от нейрона к нейрону) по меньшей мере примерно на 10 %, по меньшей мере примерно на 20 %, по меньшей мере примерно на 25 %, по меньшей мере примерно на 50 % или более, чем на 50 % по сравнению с передачей от клетки к клетке перед введением антитела к Tay по изобретению.

В некоторых случаях введение антитела к Tay по изобретению субъекту уменьшает количество агрегатов Tay (например, внутриклеточных (в том числе, внутри нейронов) агрегатов Tay) по меньшей мере примерно на 10 %, по меньшей мере примерно на 20 %, по меньшей мере примерно на 25 %, по меньшей мере примерно на 50 % или более, чем на 50 % по сравнению с количеством агрегатов Tay перед введением антитела к Tay по изобретению.

В некоторых случаях введение антитела к Tay по изобретению субъекту уменьшает нейротоксичность у субъекта и/или нейровоспаление у субъекта; и/или снижает

активность астроцитов и микроглии; и/или снижает индукцию патологических электрофизиологических ответов, и/или уменьшает количество Tau в экзосомах.

В некоторых случаях введение антитела к Tau по изобретению субъекту уменьшает гиперактивность нейронов по меньшей мере примерно на 10 %, по меньшей мере примерно на 20 %, по меньшей мере примерно на 25 %, по меньшей мере примерно на 50 %, или более, чем на 50 % по сравнению с уровнем степени гиперактивности нейронов перед введением антитела к Tau. В некоторых случаях введение антитела к Tau по изобретению субъекту уменьшает гиперактивность нейронов по меньшей мере примерно на 10 %, по меньшей мере примерно на 20 %, по меньшей мере примерно на 25 %, по меньшей мере примерно на 50 %, или более, чем на 50 %, о чём свидетельствуют данные регистрации фиксации общего потенциала нейрона; например, регистрации фиксации общего потенциала кортикоального нейрона, полученного из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC-CN) или культур кортикоальных нейронов человека (НСС).

Введение подходящих композиций можно осуществлять разными путями, например, внутривенно, интраперитонеально, подкожно, интракраниально, интратекально, интраартериально (например, через сонную артерию), внутримышечно, интраназально, топически или внутрикожно или путём доставки в спинной мозг или в головной мозг. Аэрозольные составы, такие как составы для назального спрея, включают очищенные водные или другие растворы активного агента вместе с консервантами и изотоническими агентами. У таких составов регулируют значение pH и изотоническое состояние, чтобы они были совместимыми с мукозными мембранами в носу.

В некоторых случаях антитело к Tau по изобретению может быть модифицировано или введено в такой состав, чтобы обеспечить способность этого антитела пересекать гематоэнцефалический барьер. Такое антитело или композиция, содержащая антитело, могут быть введены субъекту, больному таупатией, различными энтеральными и парентеральными путями, включая пероральное, внутривенное введение и т. п. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртоводные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные растворы. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла. Носители для внутривенного введения включают пополнители

жидкостей и питательных веществ, пополнители электролитов (такие как на основе раствора Рингера с декстрозой) и т. п. В составах также могут быть консерванты и другие добавки, такие как, например, антимикробные вещества, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы и т. п. Кроме того, фармацевтическая композиция по изобретению может включать другие агенты, такие как дофамин или психофармакологические лекарства в зависимости от предполагаемого использования фармацевтической композиции.

Схема лечения определяется практикующим врачом или другими медицинскими работниками на основе различных клинических факторов. Как хорошо известно в медицине, дозы для любого конкретного пациента зависят от различных факторов, включая вес пациента, площадь поверхности тела, возраст, вид конкретного вводимого соединения, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья и вид других лекарств, которые вводятся совместно. Доза антитела к Тау по изобретению может составлять, например, от 0.001 мкг до 1000 мкг; однако, могут применяться дозы выше и ниже указанных пределов, особенно с учётом указанных выше факторов. Обычно доза может быть равна, например, от примерно 0.0001 до 100 мг/кг, или от примерно 0.01 до 5 мг/кг (например, 0.02 мг/кг, 0.25 мг/кг, 0.5 мг/кг, 0.75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг и т. д.) веса субъекта. Например, доза может составлять 1 мг/кг веса тела или 10 мг/кг веса тела или быть в пределах 1-10 мг/кг, или по меньшей мере 1 мг/кг. Дозы, являющиеся промежуточными в указанном интервале, также входят в объём данного изобретения. Субъектам можно вводить такие дозы ежедневно, в чередующиеся дни, еженедельно или в соответствии с любым другим расписанием, определённым эмпирическим путём. Типичная схема лечения включает введение антитела в виде многократных доз в течение продолжительного периода времени, например, по меньшей мере в течение шести месяцев. Другой вид лечения включает введение один раз каждые две недели или один раз в месяц или один раз каждые 3-6 мес. Примерные дозы включают 1-10 мг/кг или 15 мг/кг в течение последовательных дней, 30 мг/кг в течение чередующихся дней или 60 мг/кг еженедельно. В некоторых способах вводятся одновременно два или более моноклональных антител с разными специфичностями связывания, в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в пределах указанных интервалов доз. Мониторинг течения заболевания проводят периодически.

Комбинированная терапия

Антитело к Tau по изобретению можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, само по себе (например, в случае монотерапии); или при комбинированной терапии вместе с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

При лечении AD подходящие дополнительные терапевтические агенты включают, но без ограничения, ингибиторы ацетилхолинэстеразы, в том числе, но без ограничения, Aricept (донепезил), Exelon (ривастигмин), метрифонат и такрин (Cognex); антитело к А β ; нестериоидные противовоспалительные агенты, включая, но без ограничения, ибупрофен и индометацин; ингибиторы циклооксигеназы-2 (Сox2), такие как Celebrex (целебрекс); и ингибиторы моноаминооксидазы, такие как Selegilene (эльдеприл или депренил). Дозировка каждого из указанных агентов известна в уровне техники.

Другим подходящим дополнительным агентом при лечении AD является агент, который ингибирует агрегацию Tau, например, производное нафтохинона, которое ингибирует агрегацию Tau, как описано в патенте США № 7,605,179. Другим подходящим дополнительным агентом является агент, который ингибирует фосфорилирование Tau, например, 3-замещённое производное 4-пиримидона, которое ингибирует Tau-протеинкиназу 1, как описано в патенте США № 7,572,793.

Термин “в комбинации с”, используемый в данной заявке, относится к применению, когда, например, первое соединение вводится в течение полного курса введения второго соединения; когда первое соединение вводится в течение периода времени, который перекрывается с со временем введения второго соединения, например, когда введение первого соединения начинается до введения второго соединения и введение первого соединения заканчивается до того, как закончится введение второго соединения; когда введение второго соединения начинается до начала введения первого соединения и введение второго соединения заканчивается до окончания введения первого соединения; когда введение первого соединения начинается до введения второго соединения и введение второго соединения заканчивается до окончания введения первого соединения; когда введение второго соединения начинается до начала введения первого соединения и введение первого соединения заканчивается до окончания введения второго соединения. Как таковой термин, “в комбинации с” может также относиться к схеме лечения, включающей введение двух или более соединений. Термин “в комбинации с”, используемый в данной заявке, относится также к введению двух или более соединений, которые могут быть введены в одном и том же составе или в разных составах, одним и тем же или разными путями и в одних и тех же или разных дозах.

Субъекты, подвергающиеся лечению

Субъекты, подходящие для лечения антителом к Tay по изобретению, включают субъектов, у которых была диагностирована таупатия; субъектов, которые могут заболеть таупатией с большим риском, чем обычная популяция (например, субъекты, имеющие генетическую предрасположенность к возникновению таупатии); субъектов с PDD и т. п. В некоторых случаях таким субъектом является взрослый человек. В некоторых случаях взрослому человеку исполнилось 30 лет или больше; 40 лет или больше, 50 лет или больше, 60 лет или больше, 70 лет или больше, или 80 лет или больше. Например, такой взрослый человек может быть в возрасте от 40 лет до 50 лет, от 50 лет до 60 лет, от 60 лет до 70 лет или старше 70 лет.

Способы снижения уровней А β 40 и А β 42

Настоящее изобретение предусматривает способ снижения уровня бета-амилоидного полипептида (например, А β ₄₀ и/или А β ₄₂) в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости у субъекта. Этот способ обычно включает введение субъекту:

- а) эффективного количества антитела, которое специфически связывает N-концевую область Tay-полипептида; или
- б) фармацевтической композиции, содержащей такое антитело. В некоторых случаях антитело является гуманизированным. Внеклеточной жидкостью может быть, например, CSF, ISF, кровь или фракция крови, такая как плазма или сыворотка.

В некоторых случаях антитело, которое специфически связывает N-концевую область Tay-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения уровней А β ₄₀ и А β ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости, представляет собой антитело, которое связывает эпитоп Tay, который находится в пределах аминокислот 2-176 Tay, например, в пределах аминокислот 2-15, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 15-50, аминокислот 50-75, аминокислот 40-60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот 125-150, аминокислот 115-140, аминокислот 150-176 или аминокислот 140-160 в Tay. Примеры Tay-полипептидов приведены на Фигуре 20; антитело, которое снижает уровень А β ₄₀ и/или А β ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости у субъекта, может быть гуманизированным антителом, которое специфически связывает эпитоп в Tay-полипептиде, показанном на Фигуре 20.

Гуманизированное антитело, которое связывает N-концевую область Tay-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения уровней А β ₄₀ и А β ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости, представляет собой гуманизированное антитело, которое связывает эпитоп Tay, который находится в пределах

аминокислот 2-176 Tay, например, в пределах аминокислот 2-15, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 15-50, аминокислот 50-75, аминокислот 40-60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот 125-150, аминокислот 115-140, аминокислот 150-176 или аминокислот 140-160 в Tay. Примеры Tay-полипептидов приведены на Фигуре 20; антитело, которое снижает уровень А β ₄₀ и/или А β ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости у субъекта, может быть гуманизированным антителом, которое специфически связывает эпитоп в Tay-полипептиде, показанном на Фигуре 20.

В некоторых случаях антитело, которое снижает уровень А β ₄₀ и А β ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости и которое пригодно для применения в способе по изобретению, может быть гуманизированным антителом к Tay по данному изобретению. В некоторых случаях антитело является гуманизированным антителом, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 в Tay.

В некоторых случаях антитело, которое связывает N-концевой участок Tay-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения А β ₄₀ и А β ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) по изобретению представляет собой антитело, которое связывает эпитоп Tay в пределах аминокислот 1-158 в Tay, например, в пределах аминокислот 1-15, аминокислот 7-13, аминокислот 2-18, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 25-30, аминокислот 15 to 50, аминокислот 19-46, аминокислот 28-126, аминокислот 50 to 75, аминокислот 40 to 60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот 125 to 150, аминокислот 115 to 140 или аминокислот 150 to 158 в Tay, при этом нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в 2N4R Tay, например, как показано на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело является гуманизированным.

В некоторых случаях антитело, которое связывает N-концевой участок Tay-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения А β ₄₀ и А β ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) по изобретению представляет собой антитело, которое связывает эпитоп Tay в пределах аминокислот 1-158 в Tay, например в пределах аминокислот 1-15, аминокислот 7-13, аминокислот 2-18, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 25-30, аминокислот 15 to 50, аминокислот 19-46, аминокислот 28-126, аминокислот 50 to 75, аминокислот 40 to 60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125,

аминокислот 80-115, аминокислот 125 to 150, аминокислот 115 to 140 или аминокислот от 150 до 158 в Tay, при этом нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в 2N4R Tay, например, как показано на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело является гуманизированным.

В некоторых случаях антитело, которое связывает N-концевой участок Tay-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения А β 40 и А β 42 в нейроне (нервной клетке) и/или в CSF по изобретению представляет собой антитело, которое связывает эпитет Тай в пределах аминокислот 1-158 в Tay, например в пределах аминокислот 1-15, аминокислот 7-13, аминокислот 2-18, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 25-30, аминокислот 15 to 50, аминокислот 19-46, аминокислот 28-126, аминокислот 50 to 75, аминокислот 40 to 60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот от 125 до 150, аминокислот от 115 до 140 или аминокислот от 150 до 158 в Tay, при этом нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в 2N4R Tay, например, как показано на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело является гуманизированным.

В некоторых случаях антитело, которое связывает N-концевой участок Tay-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения А β 40 и А β 42 в нейроне (нервной клетке) и/или в ISF по изобретению, представляет собой антитело, которое связывает эпитет Тай в пределах аминокислот 1-158 в Tay, например в пределах аминокислот 1-15, аминокислот 7-13, аминокислот 2-18, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 25-30, аминокислот 15 to 50, аминокислот 19-46, аминокислот 28-126, аминокислот 50 to 75, аминокислот от 40 до 60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот от 125 до 150, аминокислот от 115 до 140 или аминокислот от 150 до 158 в Tay, при этом нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в 2N4R Tay, например, как показано на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело является гуманизированным.

В некоторых случаях способы по изобретению включают снижение содержания бета-амилоида (А β) (например, А β 40 и/или А β 42) в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) путём введения антитела к Tay, при этом эпитет, связанный таким антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-158 в Tay, при этом нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в последовательности 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает Tay, при этом этот эпитет, связанный указанным антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-18 в Tay. В некоторых случаях

антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает Tay, при этом этот эпитоп, связанный указанным антителом, представляет собой линейный эпитоп, и эпитоп, связанный указанным антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-68 в Tay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay4-полипептид, имеющий последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO:48 (e-Tay; показана на Фигуре 61) по меньше мере на 95 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % или на 100 %. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в Tay-полипептиде, причём эпитоп находится в пределах аминокислот 2-68 в Tay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в Tay-полипептиде, причём эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 в Tay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в Tay-полипептиде, причём эпитоп находится в пределах аминокислот 7-13 в Tay, например, аминокислот EFEVMED (SEQ ID NO:87). В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в Tay-полипептиде, причём эпитоп находится в пределах аминокислот 25-30 в Tay, например, аминокислот DQGGYT (SEQ ID NO:88). В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает Tay, причём эпитоп, связанный указанным антителом, находится в пределах аминокислот 28-126 в Tay, при этом нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает Tay, причём эпитоп, связанный указанным антителом, находится в пределах аминокислот 150-158 в Tay, при этом нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает Tay, причём эпитоп, связанный указанным антителом, находится в пределах аминокислот 19-46 в Tay, при этом нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61.

В некоторых случаях способ по данному изобретению включает снижение содержания бета-амилоида ($A\beta$) (например, $A\beta$ 40 и/или $A\beta$ 42 в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка)) путём введения антитела, которое специфически связывает внеклеточный Tay (eTay), при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-158 в eTay, при этом нумерация

аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61.

В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает e-Tay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-18 eTay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный этим антителом, представляет собой линейный эпитоп, и эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-68 eTay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay4-полипептид, имеющий последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO:48 (eTay; показана на Фигуре 61) по меньше мере на 95 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % или на 100 %. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в eTay4-полипептиде, при этом этот эпитоп находится в пределах аминокислот 2-68 в eTay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в eTay4-полипептиде, при этом этот эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 в eTay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в e-Tay4-полипептиде, при этом этот эпитоп находится в пределах аминокислот 7-13 в eTay, например, аминокислот EFEVMED (SEQ ID NO:87). В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 28-126 в eTay, и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 150-158 в eTay, и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело к Tay, которое вводится, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 19-46 в eTay, и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, показанной на Фигуре 61.

Настоящее изобретение предусматривает способ лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида (например, накоплением А β 40 и/или А β 42 в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка)). Этот способ обычно включает введение субъекту: а) эффективного количества антитела (например, моноклонального

антитела), при этом такое антитело может необязательно быть гуманизированным антителом, которое связывает N-концевой участок Tau-полипептида; или b) фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное антитело.

Болезнь, ассоциируемая с накоплением бета-амилоида, согласно настоящему изобретению может быть заболеванием, при котором уровень А β 40 и/или А β 42 в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) у субъекта выше, чем нормальный контрольный уровень. Заболевания, ассоциируемые с накоплением бета-амилоида, включают, например, болезнь Альцгеймера. Способы лечения согласно настоящему изобретению могут обеспечить снижение уровней бета-амилоидного белка (например, А β 40 и/или А β 42 в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка)) по меньшей мере примерно на 10 %, по меньшей мере примерно на 15 %, по меньшей мере примерно на 20 %, по меньшей мере примерно на 25 %, по меньшей мере примерно на 50 % или более, чем на 50 %, по сравнению с уровнем бета-амилоидного белка у субъекта, не подвергавшегося лечению при помощи антитела к Tau. Так, например, в некоторых случаях эффективное количество антитела к Tau представляет собой то количество, которое обеспечивает снижение уровня А β 40 в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) по меньшей мере примерно на 10 %, по меньшей мере примерно на 15 %, по меньшей мере примерно на 20 %, по меньшей мере примерно на 25 %, по меньшей мере примерно на 50 % или более, чем на 50 %, по сравнению с уровнем А β 40 в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости в отсутствие лечения при помощи антитела к Tau или перед началом лечения при помощи антитела к Tau. В некоторых случаях эффективное количество антитела к Tau представляет собой то количество, которое обеспечивает снижение уровня А β 42 в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) по меньшей мере примерно на 10 %, по меньшей мере примерно на 15 %, по меньшей мере примерно на 20 %, по меньшей мере примерно на 25 %, по меньшей мере примерно на 50 % или более, чем на 50 %, по сравнению с уровнем А β 40 в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости в отсутствие лечения при помощи антитела к Tau или перед началом лечения при помощи антитела к Tau. В некоторых случаях эффективное количество антитела к Tau представляет собой то количество, которое обеспечивает снижение уровня А β 42 и А β 40 в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции

крови, такой как плазма или сыворотка) по меньшей мере примерно на 10 %, по меньшей мере примерно на 15 %, по меньшей мере примерно на 20 %, по меньшей мере примерно на 25 %, по меньшей мере примерно на 50 % или более, чем на 50 %, по сравнению с уровнем А_β42 и А_β40 в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости в отсутствие лечения при помощи антитела к Tay или перед началом лечения при помощи антитела к Tay. Антитело, которое связывает N-концевой участок Tay-полипептида (возможно гуманизированное антитело, например, моноклональное антитело) и которое пригодно для применения при осуществлении способа лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, по изобретению представляет собой антитело, которое связывает эпитоп Tay, который находится в пределах аминокислот 1-158 в Tay, например, в пределах аминокислот 1-15, аминокислот 7-13, аминокислот 2-18, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 19-46, аминокислот 25-30, аминокислот 15-50, аминокислот 28-126, аминокислот 50-75, аминокислот 40-60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот 125-150, аминокислот 115-140 или аминокислот 150-158 в Tay, при этом нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, например, показанной на Фигуре 61. В некоторых случаях антитело является гуманизированным.

В некоторых случаях антитело, которое снижает уровень бета-амилоида (например, А_β₄₀ и/или А_β₄₂) в нейроне и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) у субъекта и пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, представляет собой гуманизированное антитело к Tay по изобретению. В некоторых случаях антитело является гуманизированным антителом, которое связывает эпитоп (например, линейный эпитоп) в пределах аминокислот 15-24 в Tay.

В некоторых случаях способ снижения уровней бета-амилоида включает введение антитела к Tay, которое не требует наличия инсерции 2N Tay для связывания с Tay. В некоторых случаях эпитоп, распознаваемый антителом к Tay, пригодный для применения в способе снижения уровней бета-амилоида (например, А_β₄₀ и/или А_β₄₂) в нейроне и/или во внеклеточной жидкости у субъекта по изобретению не находится в инсерции 2N Tay. Инсерция 2N в Tay включает аминокислоты 45-102 аминокислотной последовательности 2N4R, показанной на Фигуре 61.

В некоторых случаях антитело к Tay, которое пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный этим антителом, содержит остатки

аминокислот в пределах аминокислот 2-68 в Tay. В некоторых случаях антитело к Tay, которое пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает внеклеточный Tay (eTay), при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-68 в eTay. В некоторых случаях антитело к Tay, пригодное для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает eTay, при этом эпитоп, связанный этим антителом, представляет собой линейный эпитоп и этот эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-68 в eTay. В некоторых случаях антитело к Tay, пригодное для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает eTay4-полипептид, имеющий последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO:48 (eTay; показана на Фигуре 61), по меньше мере на 95 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % или на 100 %. В некоторых случаях антитело к Tay, пригодное для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает линейный эпитоп в eTay4-полипептиде, при этом такой эпитоп находится в переделах аминокислот 2-68 в eTay4. В любом из описанных выше вариантов антитело может быть гуманизированным.

В некоторых случаях антитело, которое снижает уровень бета-амилоидов, (например, A β ₄₀ и/или A β ₄₂) в нейронной клетке и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) у субъекта и которое пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный таким антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-158 в Tay, и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, например, показанной на Фигуре 61. Согласно некоторым из этих вариантов такое антитело является гуманизированным. Согласно некоторым из этих вариантов указанный эпитоп является линейным.

В некоторых случаях антитело, которое снижает уровень бета-амилоидов, (например, A β ₄₀ и/или A β ₄₂) в нейронной клетке и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) у субъекта и которое пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный этим антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-18 в Tay, и нумерация аминокислот основана на аминокислотной

последовательности 2N4R Tay, например, показанной на Фигуре 61. Согласно некоторым из этих вариантов такое антитело является гуманизированным. Согласно некоторым из этих вариантов указанный эпитоп является линейным.

В некоторых случаях антитело, которое снижает уровень бета-амилоидов, (например, A β ₄₀ и/или A β ₄₂) в нейронной клетке и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) у субъекта и которое пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный этим антителом, содержит остатки аминокислот в пределах 7-13 в Tay, и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, например, показанной на Фигуре 61. Согласно некоторым из этих вариантов такое антитело является гуманизированным. Согласно некоторым из этих вариантов указанный эпитоп является линейным.

В некоторых случаях антитело, которое снижает уровень бета-амилоидов, (например, A β ₄₀ и/или A β ₄₂) в нейронной клетке и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) у субъекта и которое пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный этим антителом, содержит остатки аминокислот в пределах 25-30 в Tay, и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, например, показанной на Фигуре 61. Согласно некоторым из этих вариантов такое антитело является гуманизированным. Согласно некоторым из этих вариантов указанный эпитоп является линейным.

В некоторых случаях антитело, которое снижает уровень бета-амилоидов, (например, A β ₄₀ и/или A β ₄₂) в нейронной клетке и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) у субъекта и которое пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный этим антителом, содержит остатки аминокислот в пределах 28-126 в Tay, и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, например, показанной на Фигуре 61. Согласно некоторым из этих вариантов такое антитело является гуманизированным. Согласно некоторым из этих вариантов указанный эпитоп является линейным.

В некоторых случаях антитело, которое снижает уровень бета-амилоидов, (например, A β ₄₀ и/или A β ₄₂) в нейронной клетке и/или во внеклеточной жидкости

(например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) у субъекта и которое пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный этим антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 19-46 в Tay, и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, например, показанной на Фигуре 61. Согласно некоторым из этих вариантов такое антитело является гуманизированным. Согласно некоторым из этих вариантов указанный эпитоп является линейным.

В некоторых случаях антитело, которое снижает уровень бета-амилоидов, (например, A β ₄₀ и/или A β ₄₂) в нейронной клетке и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) у субъекта и которое пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает Tay, при этом эпитоп, связанный этим антителом, содержит остатки аминокислот в пределах 150-158 на Tay, и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Tay, например, показанной на Фигуре 61. Согласно некоторым из этих вариантов такое антитело является гуманизированным. Согласно некоторым из этих вариантов указанный эпитоп является линейным.

АНТИТЕЛА К ТАУ

Настоящее изобретение предусматривает выделенные антитела к Tay и фармацевтические композиции, содержащие эти антитела.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах N-концевого участка Tay-полипептида (например, линейный эпитоп в пределах аминоконцевого (N-концевого) участка Tay, например, в пределах аминокислот 1-25 в Tay, в пределах аминокислот 1-18 в Tay, в пределах аминокислот от 9 до 18 в Tay (где аминокислотами 1-18 в Tay являются: MAEPRQEFEVMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 в Tay, в пределах аминокислот 13-24 в Tay или в пределах аминокислот 15-24 в Tay (где аминокислотами 15-24 в Tay являются: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51). В некоторых случаях антитело представляет собой гуманизированное антитело, например, одна или более каркасных областей вариабельного участка тяжёлой цепи и/или вариабельного участка лёгкой цепи включают последовательности, полученные из каркасной области иммуноглобулина человека.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное гуманизированное моноклональное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах

аминокислот 15-24 Tay-полипептида. В некоторых случаях эпигоп не содержит фосфорилированной аминокислоты. В некоторых случаях эпигоп не содержит нитрованной аминокислоты. В некоторых случаях эпигоп содержит фосфорилированную аминокислоту, нитрованную аминокислоту или и фосфорилированную кислоту, и нитрованную кислоту.

Гуманизация каркасной (-ых) области (-ей) снижает риск того, что у людей будет возникать реакция на человеческое антимышиное антитело ХАМА (НАМА). Признанные в уровне техники методы определения иммунного ответа можно применять для мониторинга реакции на НАМА у конкретного пациента или во время клинических испытаний. У пациентов с введёнными гуманизированными антителами проводят оценку иммуногенности в начале терапевтического лечения и в течение его проведения. Реакцию на НАМА оценивают, например, путём обнаружения антител к гуманизированному терапевтическому реагенту в образцах сыворотки, отобранных у пациента, с использованием метода, известного в уровне техники, включая технологию поверхностного плазмонного резонанса (BIACORE) и/или метод твёрдофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Во многих случаях гуманизированное антитело к Tay по изобретению по существу не приводит к возникновению реакции на НАМА у человека. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay по изобретению снижало иммуногенный потенциал, что подтверждалось методом анализа EpiScreenTM, который осуществляли с использованием мононуклеарных клеток периферической крови, истощённых по CD8⁺-клеткам. В некоторых случаях гуманизированное антитело к Tay по изобретению характеризовалось индексом стимуляции менее 2.0.

Некоторые аминокислоты из остатков каркасной области вариабельного участка человека выбираются для замены на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Необычное смежное положение областей мышиных CDR и каркасной области вариабельного участка человека может привести к необычным конформационным ограничениям, которые, если их не скорректировать путём замены остатков некоторых аминокислот, приведут к потере аффинности связывания.

Выбор остатков аминокислот для замены может быть частично определён при помощи компьютерного моделирования. Компьютерное аппаратурное и программное обеспечение для получения трёхмерных изображений молекул иммуноглобулинов известно в уровне техники. В общем, молекулярные модели цепей иммуноглобулина или их доменов создают, исходя из растворённых структур. Цепи, которые нужно моделировать, сравнивают на подобие аминокислотных последовательностей с цепями или доменами растворённых трёхмерных структур, и цепи иди домены, которые

характеризуются самым большим подобием последовательностей, выбирают в качестве исходных для создания молекулярной модели. Цепи или домены, обладающие идентичностью последовательностей равной по меньшей мере 50 %, выбирают для моделирования, например, те, которые обладают идентичностью последовательностей, составляющей по меньшей мере 60 %, 70 %, 80 %, 90 % или более, чем 90 %, выбирают для моделирования. Растворённые исходные структуры модифицируют для получения разницы между действительными аминокислотами в цепях или доменах иммуноглобулина, которые моделируют, и аминокислотами в исходной структуре. Затем модифицированные структуры собирают в сложную молекулу иммуноглобулина. Наконец, модель очищают путём минимизации энергии и проверки того, что все атомы находятся на соответствующих расстояниях друг от друга и что длины связей и углы находятся в химически приемлемых пределах.

CDR и каркасные области определяются в соответствии с номенклатурой по Кабату, см. Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991). Альтернативное определение структуры было предложено Чотиа, см. Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Nature 342:878 (1989); and J. Mol. Biol. 186:651 (1989) (эти обе публикации объединены под названием "Chothia"). Когда остатки каркасной области, определенные согласно номенклатуре по Kabat, *supra*, составляют структурную петлю, определённую согласно номенклатуре по Chothia, *supra*, аминокислоты, содержащиеся в мышном антителе, могут быть выбраны для замены в гуманизированном антителе. Остатки, которые "расположены рядом с областью CDR" включают остатки аминокислот в положениях, непосредственно прилегающих к одной или более CDRs в первичной последовательности гуманизированной цепи иммуноглобулина, например, в положениях, непосредственно прилегающих к CDR, как определено согласно номенклатуре по Kabat, или к CDR, как определено согласно номенклатуре по Chothia (см., например, Chothia and Lesk JMB 196:901 (1987)). Есть основания полагать, что эти аминокислоты взаимодействуют с аминокислотами в CDRs и, если выбраны из акцепторов, деформируют донорские CDRs и снижают аффинность. Более того, соседние аминокислоты могут взаимодействовать непосредственно с антигеном (Amit et al., Science, 233:747 (1986)), и выбор этих аминокислот из доноров может быть желательным для поддержания всех контактов антигена, которые обеспечивают аффинность в исходном антителе.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело, содержащее каркасную область гуманизированной лёгкой цепи и каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи, при этом при связывании с эпитопом на N-концевом

участке Tay-полипептида выделенное антитело конкурирует с антителом, которое включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и б) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. В некоторых случаях область лёгкой цепи и область тяжёлой цепи находятся в разных полипептидах. В других случаях область лёгкой цепи и область тяжёлой цепи находятся в одном полипептиде. Выделенное антитело может включать тяжёлую цепь, которая содержит константную область изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В других случаях антитело является фрагментом Fv, scFv, Fab, F(ab')2 или Fab'. Антитело может включать ковалентно связанный непептидный синтетический полимер, например, синтетическим полимером является полиэтиленгликоль. В некоторых случаях выделенное антитело связано, непосредственно или при помощи линкера, с молекулой носителя, пептида или белка, который способствует переносу (транспорту) через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях эпитоп, связанный выделенным антителом, находится в пределах аминокислот 15-24 Tay-полипептида. Каркасная область гуманизированной лёгкой цепи выделенного антитела может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, показанных в Таблице 3. Каркасная область гуманизированной лёгкой цепи выделенного антитела содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, показанных в Таблице 2.

Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по изобретению (например, антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитоп на Tay-полипептиде, например, линейный эпитоп в аминоконцевой (N-концевой) части Tay, например, в пределах аминокислот 1-25 Tay, в пределах аминокислот 1-18 Tay, в пределах аминокислот от 9 до 18 Tay (причём аминокислоты 1-18 в Tay представляют собой: MAEPRQEFEV ред MEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 в Tay, в пределах аминокислот 13-24 в Tay или в пределах аминокислот 15-24 в Tay (причём аминокислоты 15-24 в Tay представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)), включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) один, два или три гипервариабельных

участка (CDRs), антитела IPN001, при этом CDRs являются участками, определёнными в соответствии с номенклатурой по Kabat (см., например, Таблицу 1 выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991)).

Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по изобретению (например, антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитоп на Tay-полипептиде, например, линейный эпитоп в аминоконцевой (N-концевой) части Tay, например, в пределах аминокислот 1-25 в Tay, в пределах аминокислот 1-18 в Tay, в пределах аминокислот от 9 до 18 в Tay (причём аминокислоты 1-18 в Tay представляют собой: MAEPRQEFEVMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 в Tay, в пределах аминокислот 13-24 в Tay или в пределах аминокислот 15-24 в Tay (причём аминокислоты 15-24 в Tay представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)), включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN001; и ii) каркасную область гуманизированной лёгкой цепи; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_H CDRs антитела IPN001; и ii) каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи; при этом V_H и V_L CDRs определены в соответствии с номенклатурой по Kabat (см., например, Таблицу 1, выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991)). Согласно некоторым из этих вариантов антитело к Tay включает гуманизированную каркасную область V_H и/или V_L.

Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по изобретению (например, антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитоп на Tay-полипептиде, например, линейный эпитоп в аминоконцевой (N-концевой) части Tay, например, в пределах аминокислот 1-25 в Tay, в пределах аминокислот 1-18 в Tay, в пределах аминокислот от 9 до 18 в Tay (причём аминокислоты 1-18 в Tay представляют собой: MAEPRQEFEVMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 в Tay, в пределах аминокислот 13-24 в Tay или в пределах аминокислот 15-24 в Tay (причём аминокислоты 15-24 в Tay представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)), включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN001; и ii) каркасную область гуманизированной лёгкой цепи; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_H CDRs антитела IPN001; и ii) каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи; при этом V_H и V_L CDRs определены в соответствии с номенклатурой по Chothia (см., например, Таблицу 1 выше; и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по настоящему изобретению (например, антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитет на Tay-полипептиде, например, линейный эпитет на аминоконцевом (N-концевом) участке Tay-полипептида, в пределах аминокислот 1-25 Tay-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Tay-полипептида, в пределах аминокислот от 9 до 18 Tay-полипептида (где аминокислоты 1-18 Tay: MAEPRQEFEVMDHAGTY; (SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Tay- полипептида, в пределах аминокислот 13-24 Tay-полипептида или в пределах аминокислот 15-24 Tay-полипептида (где аминокислоты 15-24 Tay-полипептида следующие: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)) включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) один, два или три домена (участка) V_L CDR антитела IPN002; и ii) каркасную область гуманизированной лёгкой цепи; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: i) один, два или три домена (участка) V_H CDR антитела IPN002; и ii) каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи; где V_H и V_L CDR определяются в соответствии с номенклатурой Kabat (см., например, Таблица 1, выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)).

Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по настоящему изобретению (например, антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитет на Tay-полипептиде, например, линейный эпитет на аминоконцевом (N-концевом) участке Tay-полипептида, в пределах аминокислот 1-25 Tay-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Tay-полипептида, в пределах аминокислот от 9 до 18 Tay-полипептида (где аминокислоты 1-18 Tay: MAEPRQEFEVMDHAGTY; (SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Tay- полипептида, в пределах аминокислот 13-24 Tay-полипептида или в пределах аминокислот 15-24 Tay-полипептида (где аминокислоты 15-24 Tay-полипептида следующие: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)) включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_L CDR антитела IPN002; и ii) каркасную область гуманизированной лёгкой цепи; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_H CDR антитела IPN002; и ii) каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи; где V_H и V_L CDR определяются в соответствии с номенклатурой Chothia (см, например, Table 1, выше; и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по настоящему изобретению (например, антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитет на Tay-полипептиде, например, линейный эпитет на аминоконцевом (N-концевом) участке Tay-полипептида, в пределах аминокислот 1-25 Tay-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Tay-полипептида, в пределах аминокислот от 9 до 18 Tay-полипептида (где аминокислоты 1-18 Tay: MAEPRQEFEVMDHAGTY; (SEQ ID NO:53), в пределах

аминокислот 15-44 Tay- полипептида, в пределах аминокислот 13-24 Tay-полипептида или в пределах аминокислот 15-24 Tay-полипептида (где аминокислоты 15-24 Tay-полипептида следующие: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)) включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) один, два или три участка CDR, выбранных из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3; ii) каркасную область гуманизированной лёгкой цепи; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: i) один, два или три участка CDR, выбранных из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6; и ii) каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи.

Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по настоящему изобретению (например, антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитет на Tay-полипептиде, например, линейный эпитет на аминоконцевом (N-концевом) участке Tay-полипептида, в пределах аминокислот 1-25 Tay-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Tay-полипептида, в пределах аминокислот от 9 до 18 Tay-полипептида (где аминокислоты 1-18 Tay: MAEPRQEFEVMEDHAGTY; (SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Tay- полипептида, в пределах аминокислот 13-24 Tay-полипептида или в пределах аминокислот 15-24 Tay-полипептида (где аминокислоты 15-24 Tay-полипептида следующие: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)) включает: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) один, два или три участка CDR, выбранных из SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9; ii) каркасную область гуманизированной лёгкой цепи; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: i) один, два или три участка CDR, выбранных из SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12; и ii) каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи.

В некоторых примерах антитело содержит: а) область лёгкой цепи, включающую: i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и (iv) каркасную область гуманизированной лёгкой цепи; и b) область тяжёлой цепи, включающую: (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12; и iv) FR4 гуманизированной тяжёлой цепи.

Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по изобретению содержит вариабельную область тяжёлой цепи, включающую один, два или три участка CDR

тяжёлой цепи, имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из одной или более последовательностей: SEQ ID NO: 4, 5 и 6; и одна, две, три или четыре FR области, которые являются гуманизированными. Например, согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит вариабельную область тяжёлой цепи, которая включает, по порядку, от N-конца к C-концу: FR1 гуманизированной тяжёлой цепи; участок CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4; FR2 гуманизированной тяжёлой цепи; участок CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5; FR3 гуманизированной тяжёлой цепи; участок CDR3, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:6; и FR4 гуманизированной тяжёлой цепи.

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по изобретению содержит вариабельную область тяжёлой цепи, включающую один, два или три участка CDR лёгкой цепи, имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из одной или более последовательностей SEQ ID NOs:1, 2 и 3; и одну, две, три или четыре FR области, которые являются гуманизированными. Например, согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит вариабельную область лёгкой цепи, которая включает, по порядку, от N-конца к C-концу: FR1 гуманизированной лёгкой цепи; участок CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1; FR2 гуманизированной лёгкой цепи; CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2; FR3 гуманизированной лёгкой цепи; CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3; и FR4 гуманизированной лёгкой цепи.

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по изобретению содержит вариабельную область тяжёлой цепи, включающую один, два или три участка CDR тяжёлой цепи, имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из одной или более последовательностей SEQ ID NOs:10, 11 и 12; и одну, две, три или четыре FR области, которые являются гуманизированными. Например, согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит вариабельную область тяжёлой цепи, которая включает, по порядку, от N-конца к C-концу: FR1 гуманизированной тяжёлой цепи; участок CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10; FR2; гуманизированной тяжёлой цепи; CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11; FR3 гуманизированной тяжёлой цепи; CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:12; и FR4 гуманизированной тяжёлой цепи.

Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по изобретению содержит вариабельную область лёгкой цепи, включающую один, два или три участка CDR лёгкой цепи, имеющих полипептидную последовательность, выбранную из одной или более последовательностей SEQ ID NOs:7, 8 и 9; и одну, две, три или четыре FR области, которые являются гуманизированными. Например, согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит вариабельную область лёгкой цепи, которая включает, по порядку, от N-конца к С-концу: FR1 гуманизированной лёгкой цепи; CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:7; FR2 гуманизированной лёгкой цепи; CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8; FR3 гуманизированной лёгкой цепи; CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9; и FR4 гуманизированной лёгкой цепи.

V_H и V_L аминокислотные последовательности антитела IPN001 изображены на Фигурах 1A и 1B. CDR (по номенклатуре Kabat) выделены жирным шрифтом и подчёркнуты. Аминокислотные последовательности V_H и V_L антитела IPN002 показаны на Фигурах 2A и 2B. CDR (по номенклатуре Kabat) выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

SEQ ID NOs:1-12 представлены ниже:

RSSQTILHSNGNTYLE (SEQ ID NO:1);
KVSKRFS (SEQ ID NO:2);
FQGSLVPWA (SEQ ID NO:3);
SYGMS (SEQ ID NO:4);
TISSSGSRTYFPDSVKKG (SEQ ID NO:5);
TWDGAMDY (SEQ ID NO:6);
KSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:7);
KVSNRFS (SEQ ID NO:8);
FQGSLVPWA (SEQ ID NO:9);
KYGMS (SEQ ID NO:10);
TISSSGSRTYYPDSVKKG (SEQ ID NO:11);
SWDGAMDY (SEQ ID NO:12).

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 1В и представленной в SEQ ID NO:13.

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 1А и представленной в SEQ ID NO:14.

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 2В и представленной в SEQ ID NO:15.

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 2А и представленной в SEQ ID NO:16.

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 9 (VH вариант 1).

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 10 (VH вариант 2).

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 11 (VH вариант 3).

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 12 (VH вариант 4).

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 13 (Vk вариант 1).

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 14 (V_k вариант 2).

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 15 (V_k вариант 3).

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, изображённой на Фигуре 16 (V_k вариант 4).

Антитело к Tay по изобретению может иметь вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен в каркасной области (FR) по сравнению с аминокислотными последовательностями FR исходного (первичного) антитела IPN002, изображённых в Таблице 2.

Таблица 2: VH варианты

Положение аминокислоты	IPN002 (Исходное антитело)	VH Вариант 1	VH Вариант 2	VH Вариант 3	VH Вариант 4
FR1					
3	H	H	H	Q	Q
19	K	R	R	R	R
FR2					
40	T	A	A	A	A
42	D	G	G	G	G
44	R	G	G	G	G
FR3					
66	Q	R	R	R	R
83	S	S	N	N	N
86	K	K	R	R	R
87	S	S	A	A	A
93	S	S	S	S	A
FR4					
108	S	S	T	T	T

Например, антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область тяжёлой цепи, включающую замену H→Q в положении аминокислоты 3 в VH FR1 и/или замену K→R в положении аминокислоты 19 в VH FR1.

В другом примере антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область тяжёлой цепи, включающую замену T→A в положении аминокислоты 40 в VH FR2 и/или замену D→G в положении аминокислоты 42 в VH FR2 и/или замену R→G в положении аминокислоты 44 в VH FR2.

В другом примере антитело к Tay по изобретению может иметь вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую замену Q→R в положении 66 в VH FR3, и/или замену S→N в положении аминокислоты 83 в VH FR3, и/или замену L→S в положении аминокислоты 85 в VH FR3, и/или замену K→R в положении аминокислоты 86 в FR3 и/или замену S→A в положении аминокислоты 87 в VH FR3 и/или замену S→A в положении аминокислоты 93 в VH FR3.

Ещё в одном примере антитело к Tay по изобретению может иметь вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую замену S→T в положении аминокислоты 108 в VH FR4.

В некоторых случаях выделенное антитело к Tay по изобретению может содержать VH область, содержащую, по порядку, от N-конца к C-концу: EVX₁LVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFSFS (SEQ ID NO:83); участок VH CDR1, показанный на Фигуре 2А; WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:84); VH CDR2, показанный на Фигуре 2А; RFTISRDNAKNTLYLQMX₂SX₃X₄X₅EDTAMYYCX₆I (SEQ ID NO:85); VH CDR3, показанный на Фигуре 2А; WGQGTX₇VTVSS (SEQ ID NO:86), где X₁ обозначает H или Q; X₂ обозначает S или N; X₃ обозначает S или L; X₄ обозначает K или R; X₅ обозначает S или A; X₆ обозначает S или A; и X₇ обозначает S или T.

Антитело к Tay по изобретению может содержать вариабельную область лёгкой цепи, включающую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен в каркасной области (FR) по сравнению с аминокислотными последовательностями FR исходного антитела IPN002, показанные в Таблице 3.

Таблица 3: Vk варианты

Положение аминокислоты	IPN002 (Исходное антитело)	Vk Вариант 1	Vk Вариант 2	Vk Вариант 3	Vk Вариант 4
FR1					
3	L	L	V	V	V
7	T	S	S	S	S
14	S	T	T	T	T
17	D	Q	Q	Q	Q
18	Q	P	P	P	P
FR2					
45	K	Q	Q	Q	Q
48	V	V	V	V	I
FR3					
83	L	V	V	V	V
85	T	T	T	V	V
FR4					
104	L	V	V	V	V

Например, антитело к Tay по изобретению может иметь вариабельную область лёгкой цепи, содержащую замену L→V в аминокислотном положении 3 в VL FR1, и/или

замену T→S в положении аминокислоты 7 в VL FR1 и/или замену S→T в положении аминокислоты 14 в VL FR1, и/или D→Q замену в положении аминокислоты 17 в VL FR1, и/или замену Q→P в положении аминокислоты 18 в VL FR1.

В другом примере антитело к Tay по изобретению может иметь вариабельную область лёгкой цепи, содержащую замену K→Q в положении аминокислоты 45 в VL FR2 и/или замену V→I в положении аминокислоты 48 VL FR2.

В другом примере антитело к Tay по изобретению может иметь вариабельную область лёгкой цепи, содержащую замену L→V в положении аминокислоты 83 в VL FR3 и/или замену T→V в положении аминокислоты 85 в VL FR3.

В другом примере антитело к Tay по изобретению может иметь вариабельную область лёгкой цепи, содержащую замену L→V в положении аминокислоты 104 в VL FR4.

В некоторых случаях выделенное антитело к Tay по изобретению может содержать VL область, содержащую, по порядку, от N-конца к C-концу: DVX₁MTQSPLSLPVTLGQPASISC (SEQ ID NO:54); участок VL CDR1, показанный на Фигуре 2B; WYLQKPGQSPQLLX₂Y (SEQ ID NO:55); VL CDR2, показанный на Фигуре 2B; GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGX₃YYC (SEQ ID NO:56); VL CDR3, показанный на Фигуре 2B; FGGGTKEIK (SEQ ID NO:57); где X₁ обозначает L или V; X₂ обозначает V или I; и X₃ обозначает T или V.

В некоторых случаях антитело к Tay по настоящему изобретению содержит:

- a) VH вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 9; и Vk вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 13;
- b) VH вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 9; и Vk вариант 2, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 14;
- c) VH вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 9; и Vk вариант 3, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 15;
- d) VH вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 9; и Vk вариант 4, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 16;
- e) VH вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 10; и Vk вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 13;

f) VH вариант 2, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 10; и Vk вариант 2, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 14;

g) VH вариант 2, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 10; и Vk вариант 3, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 15;

h) VH вариант 2, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 10; и Vk вариант 4, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 16;

i) VH вариант 3, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 11; и Vk вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 13;

j) VH вариант 3, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 11; и Vk вариант 2, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 14;

k) VH вариант 3, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 11; и Vk вариант 3, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 15;

l) VH вариант 3, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 11; и Vk вариант 4, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 16;

m) VH вариант 4, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 12; и Vk вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 13;

n) VH вариант 4, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 12; и Vk вариант 2, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 14;

o) VH вариант 4, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 12; и Vk вариант 3, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 15; или

p) VH вариант 4, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 12; и Vk вариант 4, содержащий аминокислотную последовательность, изображённую на Фигуре 16.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит CDR тяжёлой цепи антитела к Tay и CDR лёгкой цепи антитела к Tay в одной полипептидной цепи,

например, согласно некоторым вариантам антитело по изобретению представляет собой scFv. Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит, по порядку, от N-конца по направлению к C-концу: первую аминокислотную последовательность длиной от примерно 5 аминокислот до примерно 25 аминокислот; участок (домен) CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1; вторую аминокислотную последовательность длиной от примерно 5 аминокислот до примерно 25 аминокислот; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2; третью аминокислотную последовательность длиной от примерно 5 аминокислот до примерно 25 аминокислот; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3; четвёртую аминокислотную последовательность длиной от примерно 5 аминокислот до примерно 25 аминокислот; домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4; пятую аминокислотную последовательность длиной от примерно 5 аминокислот до примерно 25 аминокислот; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5; шестую аминокислотную последовательность длиной от примерно 5 аминокислот до примерно 25 аминокислот; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:6; и седьмую аминокислотную последовательность длиной от примерно 5 аминокислот до примерно 25 аминокислот.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит, по порядку, от N-конца к C-концу: область FR1 лёгкой цепи; домен (участок) CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1; область FR2 лёгкой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2; область FR3 лёгкой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3; необязательно, область FR4 лёгкой цепи; линкерную область; необязательно, область FR1 тяжёлой цепи; домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID:4; область FR2 тяжёлой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5; область FR3 тяжёлой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:6; и область FR4 тяжёлой цепи. Согласно некоторым из этих вариантов одна или более FR областей представляет собой гуманизированную FR область. Согласно некоторым из этих вариантов каждая из этих FR областей представляет собой гуманизированную FR область. Линкерная область может иметь длину от примерно 5 аминокислот до примерно 50 аминокислот, например, длину от примерно 5 аа до

примерно 10 аа, от примерно 10 аа до примерно 15 аа, от примерно 15 аа до примерно 20 аа, от примерно 20 аа до примерно 25 аа, от примерно 25 аа до примерно 30 аа, от примерно 30 аа до примерно 35 аа, от примерно 35 аа до примерно 40 аа, от примерно 40 аа до примерно 45 аа или от примерно 45 аа до примерно 50 аа.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит, по порядку, от N-конца к C-концу: область FR1 тяжёлой цепи; домен (участок) CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4; область FR2 тяжёлой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5; область FR3 тяжёлой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:6; необязательно, область FR4 тяжёлой цепи; линкер; необязательно, область FR1 лёгкой цепи; домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID:1; область FR2 лёгкой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2; область FR3 лёгкой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3; и область FR4 лёгкой цепи. Согласно некоторым из этих вариантов одна или более FR областей представляет собой гуманизированную FR область. Согласно некоторым из этих вариантов каждая из этих FR областей представляет собой гуманизированную FR область. Линкерная область может иметь длину от примерно 5 аминокислот до примерно 50 аминокислот, например, длину от примерно 5 аа до примерно 10 аа, от примерно 10 аа до примерно 15 аа, от примерно 15 аа до примерно 20 аа, от примерно 20 аа до примерно 25 аа, от примерно 25 аа до примерно 30 аа, от примерно 30 аа до примерно 35 аа, от примерно 35 аа до примерно 40 аа, от примерно 40 аа до примерно 45 аа или от примерно 45 аа до примерно 50 аа.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит, по порядку, от N-конца к C-концу: область FR1 лёгкой цепи; домен (участок) CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:7; область FR2 лёгкой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8; область FR3 лёгкой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9; необязательно, область FR4 лёгкой цепи; линкерную область; необязательно, область FR1 тяжёлой цепи; домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID:10; область FR2 тяжёлой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11; область FR3 тяжёлой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO:12; и область FR4 тяжёлой цепи. Согласно некоторым из этих вариантов одна или более FR областей представляет собой гуманизированную FR область. Согласно некоторым из этих вариантов каждая из этих FR областей представляет собой гуманизированную FR область. Линкерная область может иметь длину от примерно 5 аминокислот до примерно 50 аминокислот, например, длину от примерно 5 аа до примерно 10 аа, от примерно 10 аа до примерно 15 аа, от примерно 15 аа до примерно 20 аа, от примерно 20 аа до примерно 25 аа, от примерно 25 аа до примерно 30 аа, от примерно 30 аа до примерно 35 аа, от примерно 35 аа до примерно 40 аа, от примерно 40 аа до примерно 45 аа или от примерно 45 аа до примерно 50 аа.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит, по порядку, от N-конца к C-концу: область FR1 тяжёлой цепи; домен (участок) CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10; область FR2 тяжёлой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11; область FR3 тяжёлой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:12; необязательно, область FR4 тяжёлой цепи; линкер; необязательно, область FR1 лёгкой цепи; домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID:7; область FR2 лёгкой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8; область FR3 лёгкой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9; и область FR4 лёгкой цепи. Согласно некоторым из этих вариантов одна или более FR областей представляет собой гуманизированную FR область. Согласно некоторым из этих вариантов каждая из этих FR областей представляет собой гуманизированную FR область. Линкерная область может иметь длину от примерно 5 аминокислот до примерно 50 аминокислот, например, длину от примерно 5 аа до примерно 10 аа, от примерно 10 аа до примерно 15 аа, от примерно 15 аа до примерно 20 аа, от примерно 20 аа до примерно 25 аа, от примерно 25 аа до примерно 30 аа, от примерно 30 аа до примерно 35 аа, от примерно 35 аа до примерно 40 аа, от примерно 40 аа до примерно 45 аа или от примерно 45 аа до примерно 50 аа.

Линкеры, пригодные для применения в последовательностях антитела по изобретению, включают “гибкие линкеры”. Линкерные молекулы, в случае их присутствия, обычно имеют длину, достаточную для того, чтобы обеспечить некоторое свободное движение связанных областей друг относительно друга. Длина линкерных молекул обычно составляет примерно 6-50 атомов. Линкерными молекулами могут также являться, например, олигомеры арилацетилена, этиленгликоля, содержащие 2-10

мономерных единиц, диамины, аминокислоты или их комбинации. В свете настоящего изобретения могут применяться другие линкерные молекулы, которые могут связываться с полипептидами.

Соответствующие линкеры можно легко выбрать, они могут быть любой подходящей длины, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, включая от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот и могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

Примеры гибких линкеров включают полимеры глицина ($(G)_n$), полимеры глицин–серин (включая, например, $(GS)_n$, $GS\bar{G}S_n$ (SEQ ID NO:58) и $GG\bar{G}S_n$ (SEQ ID NO:59), где n обозначает целое число, по меньшей мере один), полимеры глицин–аланин, полимеры аланин–серин и другие гибкие линкеры, известные из уровня техники. Полимеры глицина и полимеры глицин–серин представляют интерес, так как обе эти аминокислоты являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут служить в качестве нейтрального ограничителя между компонентами. Полимеры глицина представляют особый интерес, так как значения торсионных углов (фи и пси) глицина распределены по значительно большему пространству (доступ глицина к значительно большему фи–пси пространству), чем даже у аланина, и глицин имеет значительно меньшие ограничения, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11:173-142 (1992)). Примеры гибких линкеров включают, но без ограничения, $GGSG$ (SEQ ID NO:60), $GGSGG$ (SEQ ID NO:61), $GSGSG$ (SEQ ID NO:62), $GSGGG$ (SEQ ID NO:63), $GGGSG$ (SEQ ID NO:64), $GSSSG$ (SEQ ID NO:65) и т.п. Специалист в данной области техники признает, что конструкция пептида, конъюгированного с любыми элементами, описанными выше, может включать линкеры, которые являются целиком или частично гибкими линкерами, так чтобы линкер мог включать гибкий линкер, а также один или более участков, которые придают менее гибкую структуру.

В некоторых случаях выделенное антитело по изобретению представляет собой фрагмент антитела Fv , $scFv$, Fab , $F(ab')2$ или Fab' . Таким образом, в настоящем изобретении предусматривается выделенное антитело, причём антитело представляет собой Fv , $scFv$, Fab , $F(ab')2$ или Fab' , и это антитело конкурирует за связывание с эпитопом в N-концевой области Tay-полипептида с антителом, которое содержит: а) область лёгкой цепи, включающей: i) V_L CDR1 участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) а V_L CDR2 участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) V_L CDR3

участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и b) область тяжёлой цепи, включающей: (i) V_H CDR1 участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) V_H CDR2 участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) V_H CDR3 участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. В некоторых из этих вариантов выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре гуманизированных VL каркасных области, описанных выше. В некоторых из этих вариантов выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре гуманизированных VH каркасных области, описанных выше.

Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по настоящему изобретению представляет собой scFv антитело. Согласно некоторым вариантам антитело к Tay по настоящему изобретению содержит мультимеры scFv. Например, согласно некоторым вариантам антитело по изобретению представляет собой димер scFv (например, содержит два тандемных повтора scFv (scFv₂)), тример scFv (например, содержит три тандемных повтора scFv (scFv₃)), тетрамер scFv (например, содержит четыре тандемных повтора scFv (scFv₄)) или представляет собой мультимер, содержащий более четырёх scFv (например, в тандеме). Мономеры scFv могут связываться в тандем с помощью линкеров длиной от примерно 2 аминокислот до примерно 10 аминокислот (aa), например, длиной 2 aa, 3 aa, 4 aa, 5 aa, 6 aa, 7 aa, 8 aa, 9 aa или 10 aa. Подходящие линкеры включают, например, (Gly)_x, где x обозначает целое число от 2 до 10. Другие подходящие линкеры представляют собой линкеры, обсуждавшиеся выше. Согласно некоторым вариантам каждый из scFv мономеров в обсуждаемом scFv мультимере является гуманизированным, как описано выше.

В некоторых примерах антитело по изобретению содержит константную область иммуноглобулина (например, Fc область). Fc область, если таковая присутствует, может представлять собой человеческую Fc область. Если константные области присутствуют, то антитело может содержать константные области как лёгкой, так и тяжёлой цепи. Подходящие константные области включают CH1, шарнирную, CH2, CH3 и CH4 области. Антитела по настоящему описанию включают антитела, содержащие константные области всех типов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Примером подходящей Fc области тяжёлой цепи является Fc область человеческого изотипа IgG1 Fc. В некоторых случаях область тяжёлой цепи является областью изотипа IgG4. Согласно некоторым из этих вариантов шарнирная область содержит замену S241P. См., например, Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105. Константные области лёгкой цепи могут представлять собой цепи лямбда или каппа

иммуноглобулинов. Антитело по изобретению (например, гуманизированное антитело) может содержать последовательности более чем одного класса или изотипа. Антитела могут экспрессироваться в виде тетramerов, содержащих две лёгкие и две тяжёлые цепи, в виде отдельных тяжёлых цепей, лёгких цепей, как Fab, Fab' F(ab')2 и Fv, или в виде одноцепочечных антител, у которых вариабельные области тяжёлой и лёгкой цепей связаны посредством спейсера.

Согласно некоторым вариантам в настоящем изобретении предусматривается выделенное антитело, которое содержит константную область человеческой лёгкой цепи и константную область человеческой тяжёлой цепи, и это выделенное антитело конкурирует за связывание с эпитопом в N- концевой области Tay-полипептида с антителом, содержащим: а) область лёгкой цепи, содержащую: i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; и (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и b) область тяжёлой цепи, содержащую: (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12. Согласно некоторым из этих вариантов выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре гуманизированных VL каркасных области, описанных выше. Согласно некоторым из этих вариантов выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре гуманизированных VH каркасных области, описанных выше.

Антитело по изобретению может содержать свободную тиольную (-SH) группу на карбоксильном конце, где свободная тиольная группа может применяться для связывания антитела со вторым полипептидом (например, другим антителом, включая антитело по изобретению), каркасной структурой, носителем и т.д.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит одну или более неприродных аминокислот. Согласно некоторым вариантам не кодируемые генетически неприродные аминокислоты, содержат карбонильную группу, ацетильную группу, аминооксигруппу, гидразиновую группу, гидразидную группу, семикарабазидную группу, азидную группу или алкиновую группу. Подходящие неприродные аминокислоты описаны, например, в патенте США № 7,632,924. Включение неприродной аминокислоты может обеспечить связывание с полимером, вторым полипептидом, каркасной структурой и т.д. Например, антитело по изобретению, связанное с водорастворимым полимером,

можно получать реакцией водорастворимого полимера (например, PEG (ПЭГ)), который содержит карбонильную группу, с антителом, причём антитело содержит не кодируемую естественным образом (генетически) аминокислоту, которая содержит аминооксигруппу, гидразиновую, гидразидную или семикарбазидную группу. В другом примере антитело по изобретению, связанное с водорастворимым полимером, можно получать по реакции антитела по изобретению, которое содержит алкинсодержащую аминокислоту, с водорастворимым полимером (например, PEG), содержащим азидную группу; согласно некоторым вариантам азидная или алкиновая группа связывается с молекулой PEG за счёт амидной связи. Выражение "не кодируемая генетически аминокислота" относится к аминокислоте, которая не представляет собой одну из 20 обычных (важнейших) аминокислот или пирролизин или селеноцистеин. Другие термины, которые можно употреблять в качестве синонимов выражения "не кодируемая генетически аминокислота", включают выражения "неприродная аминокислота", "ненатуральная аминокислота", "не встречающаяся в природе аминокислота" и их различные варианты с дефисом или без дефиса. Термин "аминокислота, не кодируемая генетически" включает также, но без ограничения, аминокислоты, которые получают модификацией (например, посредством посттрансляционных модификаций) генетически кодируемой аминокислоты (включая, но без ограничения, 20 обычных аминокислот или пирролизина и селеноцистеина), но они сами, естественным путём, не включаются в растущую полипептидную цепь с использованием комплекса трансляции. Примеры таких неприродных аминокислот включают, но без ограничения, N-ацетилглюкозаминал-L-серин, N-ацетилглюкозаминал-L- треонин и O-fosфотиозин.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению связано (например, ковалентной связью) с полимером (например, полимером, отличным от полипептида). Подходящие полипептиды включают, например, биосовместимые полимеры и водорастворимые биосовместимые полимеры. Подходящие полимеры включают синтетические полимеры и природные (натуральные) полимеры. Подходящие полимеры включают, например, замещённые или незамещённые линейные или разветвлённые полиалкилены, полиалкенилены или полиоксиалкенилены или линейные или разветвлённые полисахариды, например, гомо- или гетерополисахариды. Подходящие полимеры включают, например, сополимер этилена с виниловым спиртом (обычно известный под международным непатентованным названием EVOH или под торговой маркой (коммерческим названием) EVAL); полибутилметакрилат; полигидроксивалерат; поли-L-молочную кислоту; поликапролактон; полилактид–гликолид; полигидроксибутират; сополимер гидроксибутирата и валерата; полидиоксанон;

полиортотефир; полиангидрид; полигликолевую кислоту; поли-D,L-молочную кислоту; сополимер гликоловой кислоты и триметиленкарбоната; полифосфоэфир; полифосфоэфир-уретан; полiamинокислоты; цианоакрилаты; политриметиленкарбонат; полииминокарбонат; сополимеры простых и сложных эфиров (например, сополимеры полиэтиленоксид-полимолочная кислота) (PEO/PLA); полиалкиленоксалаты; полифосфазены; биомолекулы, например, такие как фибрин, фибриноген, целлюлоза, крахмал, коллаген и гиалуроновая кислота; полиуретаны; силиконы; сложные полиэфиры; полиолефины; полизобутилен и сополимеры этилена с альфа-олефинами; акриловые полимеры и сополимеры; полимеры и сополимеры винилгалогенидов, такие как поливинилхлорид; полимеры простых виниловых эфиров, например, поливинилметиловый эфир; поливинилиденгалогениды, например, поливинилиденфторид и поливинилиденхлорид; полиакрилонитрил; поливинилкетоны; полимеры винил-ароматических соединений, например, полистирол; поливиниловые эфиры, например, поливинилацетат; сополимеры виниловых мономеров друг с другом и олефинами, например, такие как сополимеры этилена с метилметакрилатом, сополимеры акрилонитрила со стиролом, ABS (АБС)-пластики и сополимеры этилена с винилацетатом; полиамиды, например, нейлон Nylon 66 и поликапролактам; алкидные смолы; поликарбонаты; полиоксиметилены; полимииды; простые полиэфиры; эпоксидные смолы; полиуретаны; вискозное (искусственное) волокно; искусственное волокно-триацетат; целлюлозу; ацетат целлюлозы; бутират целлюлозы; ацетат-бутират целлюлозы; целлофан; нитрат целлюлозы; пропионат целлюлозы; простые эфиры целлюлозы; аморфный тефлон; полиэтиленгликоль и карбоксиметилцеллюлозу.

Соответствующие синтетические полимеры включают незамещённые и замещённые линейные и разветвлённые полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт и их производные, например, замещённый полиэтиленгликоль, например, метоксиполиэтиленгликоль и их производные. Соответствующие природные полимеры включают, например, альбумин, амилозу, декстрин, гликоген и их производные.

Средняя молекулярная масса подходящих полимеров может находиться в интервале от 500 Да до 50000 Да, например, от 5000 Да до 40000 Да или от 25000 до 40000 Да. Например, согласно некоторым вариантам, если антитело по изобретению содержит полимер полиэтиленгликоль (PEG) или метоксиполиэтиленгликоль, то молекулярная масса полимеров PEG или метоксиполиэтиленгликоля может быть в интервале от примерно 0.5 килодальтона (кДа) до 1 кДа, от примерно 1 кДа до 5 кДа, от 5 кДа до 10 кДа, от 10 кДа до 25 кДа, от 25 кДа до 40 кДа или от 40 кДа до 60 кДа.

Как отмечается выше, согласно некоторым вариантам, антитело по изобретению связано ковалентной связью с полимером PEG. Согласно некоторым вариантам scFv мультимер по изобретению ковалентно связан с полимером PEG. См., например, Albrecht et al. (2006) *J. Immunol. Methods* 310:100. Способы и реагенты, применимые для пегилирования белка, в уровне техники и их можно найти, например, в патенте США № 5,849,860. Полимер PEG, применимый для конъюгации с белком, как правило, растворим в воде при комнатной температуре и имеет общую формулу $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, где R обозначает водород или защитную группу, такую как алкильная или алканольная группа, и где n обозначает целое число от 1 до 1000. Если R обозначает защитную группу, она обычно содержит от 1 до 8 углеродных атомов.

Молекула PEG, конъюгированная с антителом по изобретению, может быть линейной. Молекула PEG, конъюгированная с белком по изобретению, также может быть разветвлённой. Разветвлённые PEG производные, например, описаны в патенте США № 5,643,575, “звёздообразные-PEG” и сильно разветвлённые полимеры PEG описаны, например, в каталоге Shearwater Polymers, Inc. catalog “Polyethylene Glycol Derivatives 1997-1998.” Звездообразные полимеры PEG описаны в уровне техники, например, в патенте США № 6,046,305.

Антитело по изобретению может быть гликозилированным, например, антитело по изобретению может содержать ковалентно связанную углеводную или полисахаридную группу. Гликозилирование антител обычно идёт либо по N-связи, либо по O-связи. N-связанное гликозилирование относится к связыванию углеводного фрагмента с боковой цепью аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин–X–серин и аспарагин–X– треонин, где X обозначает любую аминокислоту, за исключением пролина, представляют собой распознающие последовательности для ферментативного связывания углеводного фрагмента с боковой цепью аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создаёт потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к связыванию одного из сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, с гидроксиаминокислотой, обычно с серином или треонином, хотя могут также применяться 5-гидроксипролин или 5-гидроксизизин.

Добавление к антителу сайтов гликозилирования удобно проводить, изменяя аминокислотную последовательность таким образом, чтобы она содержала одну или более вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение можно также осуществлять посредством добавления одного или более или замены на один или более остатков серина или треонина к (или в)

последовательности исходного антитела (для О-связанных сайтов гликозилирования). Аналогично, удаление сайтов гликозилирования можно осуществлять, изменяя аминокислотную последовательность в нативных сайтах гликозилирования антитела.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит рентгеноконтрастную "(контрастную, радиоизотопную, непроницаемую (для излучения))" метку, например, метку, которую легко визуализировать с помощью рентгеновских лучей. Рентгеноконтрастные материалы хорошо известны специалисту в данной области техники. Обычно рентгеноконтрастные материалы включают йодистые, бромистые соли или соли бария. Известны также другие рентгеноконтрастные (контрастные, радиоизотопные) материалы, они включают, но без ограничения, органические соединения висмута (см., например, патент США № 5,939,045), рентгеноконтрастные полиуретаны (см. патент США № 5,346,981), композиты, содержащие органовисмут (см, например, патент США 5,256,334), мультимерные рентгеноконтрастные комплексы бария (см., например, патент США № 4,866,132) и т.п.

Антитело по изобретению может быть ковалентно связано со второй частицей (например, липидом, полипептидом, отличным от антитела по изобретению, синтетическим полимером, углеводом и т.п.) с применением, например, глутаральдегида, гомобифункционального сшивающего агента (кросслинкера). Глутаральдегид сшивает полипептиды по аминогруппам. Гомобифункциональные сшивающие агенты (например, гомобифункциональный имидоэфир, гомобифункциональный N-гидроксисукцинимидиловый (NHS) эфир или содержащий сульфгидрильную группу гомобифункциональный реакционноспособный сшивающий агент) содержат два или более идентичных реакционноспособных фрагмента и могут применяться в одностадийной реакции, в которой сшивающий агент добавляют к раствору, содержащему смесь связывающихся полипептидов. Гомобифункциональные NHS эфир и имидоэфиры сшивают полипептиды, содержащие аминогруппу. В слабоосновной среде (pH) имидоэфиры реагируют только с первичными аминами с образованием имидоамидов, и это не влияет на общий заряд сшитых полипептидов. Гомобифункциональные реакционноспособные сульфгидрильные сшивающие агенты включают бисмалеимидогексан (ВМН), 1,5-дифтор-2,4-динитробензол (DFDNB) и 1,4-ди-(3',2'-пиридилдитио)пропионамидобутан (DPDPB).

Гетеробифункциональные сшивающие агенты содержат две или более различных реакционноспособных функциональных группы (например, реакционноспособную аминогруппу и реакционноспособную сульфгидрильную группу) и сшиваются с одним из полипептидов по амино- или сульфгидрильной группе, затем реагируют с другим

полипептидом по непрореагировавшей группе. Имеется ряд гетеробифункциональных сшивающих агентов, содержащих галогенацетильные группы, пиридилдисульфидные группы. Карбодииимиды представляют собой классический пример гетеробифункциональных сшивающих агентов для связывания карбоксильных соединений с аминами с образованием амидной связи.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению может быть иммобилизовано на твёрдой подложке (носителе). Подходящие носители хорошо известны в уровне техники и включают, среди прочих, коммерчески доступные материалы для колонок (насадки), полистирольные гранулы (шарики), латексные гранулы, магнитные гранулы, коллоидные частицы металлов, стеклянные и/или силиконовые чипы и поверхности, нитроцеллюлозные полоски, нейлоновые мембранные, листы, дурациты, лунки реакционных планшетов (например, многолуночных планшетов), пластиковые трубы и т.д. Твёрдая подложка (твёрдый носитель) может содержать любое из множества веществ, включая, например, стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозу, натуральную и модифицированную целлюлозу, полиакриламиды, агарозу и магнетит. Соответствующие методы иммобилизации антитела по изобретению на твёрдом носителе хорошо известны и включают, но без ограничения, ионное, гидрофобное, ковалентное взаимодействие и т.п. Твёрдые носители могут быть растворимыми или нерастворимыми, например, в водном растворе. Согласно некоторым вариантам соответствующий твёрдый носитель обычно нерастворим в водном растворе.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению включает детектируемую метку. Подходящие детектируемые метки включают любую композицию (состав), которую можно обнаруживать спектроскопическим, фотохимическим, биохимическим, иммунохимическим, электрическим, оптическим или химическим методом. Соответствующие метки включают, но без ограничения, магнитные гранулы (например, DynabeadsTM), флуоресцентные красители (например, флуоресцеин изотиоцианат, техасский красный, родамин, зелёный флуоресцентный белок, жёлтый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок и т.п.), радиоизотопные метки (например, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C или ³²P), ферменты (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, люциферазу и другие, применяемые обычно в твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA, ИФА)), и колориметрические метки, такие как коллоидное золото или окрашенные стеклянные или пластиковые (например, полистирольные, полипропиленовые, латексные и т.д.) гранулы.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению включает контрастный агент или радиоизотоп, где контрастный агент или радиоизотоп представляет собой такой агент или изотоп, который пригоден для визуализации, например, в исследованиях, проводимых на людях. Неограничивающие примеры меток включают радиоизотоп, например, такой, как as^{123}I (иод), ^{18}F (фтор), ^{99}Tc (технеций), ^{111}In (индий) и ^{67}Ga (галлий), и контрастный агент, например, такой как гадолиний (Gd), диспрозий и железо. Радиоактивные изотопы Gd (^{153}Gd) также доступны и применяются для визуализации на нечеловеческих млекопитающих. Антитело по изобретению можно метить стандартными методами. Например, антитело по изобретению можно иодировать с применением хлорамина Т или 1,3,4,6-тетрахлор-3а,6а-дифенилгликурила. Для фторирования вводят фтор в антитело по изобретению в процессе синтеза реакцией замещения фторид-иона. Обзоры синтеза белков с такими радиоизотопами см. Muller-Gartner, H., TIB Tech., 16:122-130 (1998) и Saji, H., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 16(2):209-244 (1999). Антитело по изобретению можно также метить контрастным агентом стандартными методами. Например, антитело по изобретению можно метить с помощью Gd, конъюгируя низкомолекулярные хелаты Gd, такие как хелат Gd с диэтилендиаминпентауксусной кислотой (GdDTPA) или хелат Gd с тетраазациклогексанетрауксусной кислотой (GdDOTA), с антителом. См. Caravan et al., Chem. Rev. 99:2293-2352 (1999) и Lauffer et al., J. Magn. Reson. Imaging, 3:11-16 (1985). Антитело по изобретению можно метить с помощью Gd, например, конъюгацией хелатов полилизин-Gd с антителом. См., например, Curtet et al., Invest. Radiol., 33(10):752-761 (1998). Или же антитело по изобретению можно метить гадолинием (Gd), инкубируя парамагнитные полимеризованные липосомы, которые включают хелат Gd с липидом, с avidinом и биотинилированным антителом. См., например, Sipkins et al., Nature Med., 4:623-626 (1998).

Подходящие флуоресцентные белки, которые можно связывать с антителом по изобретению, включают, но без ограничения, зелёный флуоресцентный белок, выделенный из медузы *Aequoria Victoria*, или его мутант или производное, например, описанные в патентах США № 6,066,476; 6,020,192; 5,985,577; 5,976,796; 5,968,750; 5,968,738; 5,958,713; 5,919,445; 5,874,304; например, улучшенный GFP, многие такие GFP являются коммерчески доступными, например, от компании Clontech, Inc.; красный флуоресцентный белок; жёлтый флуоресцентный белок; любой из ряда флуоресцентных и цветных белков из кишечнополостных животных класса Anthozoa (Коралловые полипы), описанных, например, в публикации Matz et al. (1999) *Nature Biotechnol.* 17:969-973; и т.п.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению связано (ковалентной или нековалентной связью) с партнёром, например, с лигандом; эпитопной меткой

(тегом); пептидом; белком, отличным от антитела; и т.п. Соответствующие партнёры по связыванию включают пептиды и полипептиды, которые придают повышенную стабильность *in vivo* (например, повышенный период полужизни в сыворотке крови); способствуют очистке (обеспечивают простую очистку), например, (His)_n, например, 6His, и т.п.; способствуют секреции гибридного (химерного) белка клеткой; предоставляют эпитопную метку, например, GST, гемагглютинин (HA; например, YPYDVPDYA; SEQ ID NO:71), FLAG (например, DYKDDDDK; SEQ ID NO:69), c-myc (e.g., EQKLISEEDL; SEQ ID NO:68), и т.п.; предоставляют детектируемый сигнал, например, фермент, который катализирует получение детектируемого продукта (например, β-галактозидаза, люцифераза), или белок, который можно обнаруживать сам по себе, например, зелёный флуоресцентный белок; красный флуоресцентный белок; жёлтый флуоресцентный белок и т.д.; обеспечивает мультимеризацию, например, предоставляет домен, способный к мультимеризации, например, такой как Fc участок иммуноглобулина; и т.п.

Объединение (связывание) может включать также аффинный домен, включающий пептидные последовательности, которые могут взаимодействовать с партнёром по связыванию, например, таким, который иммобилизован на твёрдом носителе, применимом для идентификации или очистки. Последовательные одиночные аминокислоты, такие как гистидин, связанные с белком, можно применять для одностадийной очистки гибридного белка посредством высокоаффинного связывания с полимером (насадкой) в колонке, таким как никель сефароза. Примеры аффинных доменов включают His5 (HHHHH) (SEQ ID NO:66), HisX6 (HHHHHH) (SEQ ID NO:67), C-myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO:68), Flag (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:69), StrepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO:70), гемагглютинин, например, HA Tag (YPYDVPDYA; SEQ ID NO:71), глутатион-S-трансферазу (GST), тиоредоксин, домен, связывающий целлюлозу, RYIRS (SEQ ID NO:72), Phe-His-His-Thr (SEQ ID NO:73), хитин–связывающий домен, S-пептид, T7 пептид, SH2 домен, С-концевой домен РНК–полимеразы, WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO:74), металловзаывающие домены, например, цинк–связывающие домены или кальций–связывающие домены, например, кальмодулин, тропонин С, кальциневрин В, лёгкая цепь миозина, рековерин, S-модулин, визинин, VILIP, нейрокальцин, гипокальцин, фреквенин, кальктрактин, большая субъединица кальпаина, S100 белки, парвальбумин, кальбиндин D9K, кальбиндин D28K и кальретинин, интеины, биотин, стрептавидин, MyoD, последовательности “лейциновой застёжки–молнии” и мальтоза–связывающий белок.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению связано с полипептидом, который связан с эндогенным рецептором гематоэнцефалического барьера (BBB, ГЭБ).

Связывание антитела субъекта с полипептидом, который связывается с эндогенным BBB рецептором, способствует проникновению через BBB, например, в методе лечения субъекта (см. ниже), включающем введение нуждающемуся в этом субъекту антитела по изобретению. Соответствующие полипептиды, которые связываются с эндогенным BBB рецептором, включают антитела, например, моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с эндогенным BBB рецептором. Применимые эндогенные BBB рецепторы включают, но без ограничения, инсулиновый рецептор, рецептор трансферрина, рецептор лептина, рецептор липопротеинов и рецептор инсулиноподобного фактора роста. См., например, опубликованную заявку на патент США № 2009/0156498.

Например, антитело к Tay по изобретению может представлять собой биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий участок, который специфически связывает эпитоп в Tay-полипептиде (например, линейный эпитоп на аминоконцевом (N-концевом) участке Tay-полипептида, например, в пределах аминокислот 1-25 Tay-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Tay-полипептида или в пределах аминокислот с 9 до 18 Tay-полипептида); и второй антигенсвязывающий участок, который связывает эндогенный BBB рецептор. Например, в некоторых примерах антитело к Tay по изобретению представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий участок, который специфически связывает эпитоп в Tay-полипептиде (например, линейный эпитоп на аминоконцевом (N-концевом) участке Tay-полипептида, например, в пределах аминокислот 1-25 Tay-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Tay-полипептида или в пределах аминокислот с 9 до 18 Tay-полипептида); и второй антигенсвязывающий участок, который связывает рецептор трансферрина.

Например, антитело к Tay по настоящему изобретению может быть связано (соединено) с пептидом, который способствует транспорту через BBB, причём этот пептид имеет длину от примерно 15 аминокислот до примерно 25 аминокислот и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 85% идентична аминокислотной последовательности одного из следующих пептидов: Angioper-1 (TFFYGGCRGKRNNFKTEEY; SEQ ID NO:75); Angioper-2 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY; SEQ ID NO:76); цис-Angioper-2 (CTFFYGGSRGKRNNFKTEEY; SEQ ID NO:77); Angioper-2-цис (TFFYGGSRGKRNNFKTEEYC; SEQ ID NO:78); и фрагмент апратинина (TFVYGGCRAKRNNFKS; SEQ ID NO:79). См., например, опубликованные заявки на патент США № 2011/0288011; и 2009/0016959. Пептид, который способствует транспорту

через ВВВ, можно связывать с N-концом области лёгкой цепи антитела к Tay, с С- концом области лёгкой цепи антитела к Tay, с N-концом области тяжёлой цепи антитела к Tay, с С- концом области тяжёлой цепи антитела к Tay, с N- концом одноцепочечного антитела к Tay по изобретению, с С- концом одноцепочечного антитела к Tay по изобретению и т.д.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению представляет собой модификацию посредством полиаминов. Модификация антитела по изобретению с помощью полиаминов повышает проницаемость ВВВ для модифицированного антитела. Антитело по изобретению может быть модифицировано полиаминами, которые являются либо природными, либо синтетическими. См., например, патент США № 5,670,477. Применимые природные (натуральные) полиамины включают путресцин, спермидин, спермин, 1,3-диаминопропан, норспермидин, син-гомоспермидин, термин, термоспермин, кальдопентамин, гомокальдопентамин и канавалмин. Чаще всего применяют путресцин, спермидин и спермин. Синтетические полиамины соответствуют эмпирической формуле $C_xH_yN_z$, они могут быть циклическими или ациклическими, разветвлёнными или неразветвлёнными, содержать углеводородные цепи из 3-12 углеродных атомов, которые также включают 1-6 групп NR или N(R)₂, где R обозначает H, (C₁-C₄) алкил, фенил или бензил. Полиамины можно связывать с антителом любым стандартным методом сшивания.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению модифицируют таким образом, чтобы оно включало углеводный фрагмент, причём углеводный фрагмент может быть ковалентно связан с антителом. Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению модифицируют таким образом, чтобы оно включало липидный фрагмент, причём липидный фрагмент может быть ковалентно связан с антителом. Подходящие липидные фрагменты включают, например, N-ацильную группу кислоты жирного ряда, например, такую как N- лауроил, N-олеоил, и т.д.; амин жирного ряда, например, такой как додециламин, олеиламин и т.д.; C3-C16 алифатический липид с длинной цепью; и т.п. См., например, патент США № 6,638,513). Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению заключено в липосому.

Способы получения антитела по изобретению

Антитело по изобретению можно получать любым известным способом, например, обычными методами синтеза белков; методами рекомбинантной ДНК и т.д.

Если антитело по изобретению представляет собой одноцепочный полипептид, его можно синтезировать стандартными методами пептидного синтеза. Если полипептид синтезируют химическими методами, синтез может осуществляться в жидкой фазе (жидкофазный синтез) или в твёрдой фазе (твердофазный синтез). Твердофазный

полипептидный синтез (SPPS), в процессе которого С-концевая аминокислота связывается с нерастворимым носителем с последующим последовательным добавлением остальных аминокислот в последовательности, является примером адекватного, подходящего для этой цели метода химического синтеза антитела по изобретению. Различные формы SPPS, такие как Fmoc и Boc, применимы для синтеза антитела по изобретению. Методы твердофазного синтеза описаны в публикациях: Barany and Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284 in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield, et al. J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963); Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); и Ganesan A. 2006 *Mini Rev. Med Chem.* 6:3-10 и Camarero JA et al. 2005 *Protein Pept Lett.* 12:723-8. Коротко говоря, к небольшим нерастворимым пористым гранулам (шарикам) прибавляют (присоединяют) функциональные единицы, на которых строят пептидную цепь. В ходе многократного повторения циклов связывания/депротекции (присоединения/снятия защиты) свободная N-концевая аминогруппа звена, иммобилизованного на твёрдой фазе, связывается с N-защищённым аминокислотным звеном. Это звено затем депротекционируют, высвобождая новую N- концевую аминогруппу, с которой может связываться следующая аминокислота. Пептид остаётся иммобилизованным на твёрдой фазе и отфильтровывается перед отщеплением.

Для получения антитела по изобретению можно применять стандартные методы рекомбинантной ДНК. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие вариабельные области лёгкой и тяжёлой цепи, необязательно связанные с константными областями, встраивают в экспрессионный вектор. Лёгкую и тяжёлую цепи можно клонировать в один и тот же экспрессионный вектор или в разные экспрессионные векторы. Сегменты ДНК, кодирующие цепи иммуноглобулинов, функционально связаны с регуляторными (контрольными) последовательностями в экспрессионном(ых) векторе(-ах), что гарантирует экспрессию полипептидов иммуноглобулинов. Последовательности, регулирующие экспрессию (регуляторные элементы экспрессии) включают, но без ограничения, промоторы (например, природно связанные или гетерологичные промоторы), сигнальные последовательности, энхансерные элементы и последовательности терминации транскрипции. Регуляторные последовательности (последовательности, регуляции экспрессии) могут представлять собой промоторную систему эукариот в векторах, способных трансформировать или трансфецировать эукариотические клетки-хозяева (например, клетки COS или CHO). После того, как вектор был введён в клетку-хозяина, хозяин поддерживается в условиях, подходящих для

высокоуровневой экспрессии нуклеотидных последовательностей, и сбора и очистки антител.

Вследствие вырожденности генетического кода каждую аминокислотную последовательность иммуноглобулина могут кодировать несколько нуклеотидных последовательностей. Нужные нуклеотидные последовательности можно получать *de novo* (с самого начала, полным) твердофазным синтезом ДНК или мутагенезом, с помощью полимеразной цепной реакции (PCR), ранее полученного варианта нужного полинуклеотида. Олигонуклеотид–опосредуемый мутагенез является примером подходящего, адекватного метода получения вариантов ДНК целевого полипептида, содержащего замену, делецию или инсерцию (вставку). См. Adelman et al., DNA 2:183 (1983). Коротко говоря, ДНК целевого полипептида изменяют посредством гибридизации олигонуклеотида, кодирующего нужную мутацию, с однонитевой ДНК–матрицей. После гибридизации используют ДНК–полимеразу для синтеза полной второй комплементарной нити матрицы, которая включает олигонуклеотидный праймер, и кодирует выбранное изменение в ДНК целевого полипептида.

Подходящие экспрессионные векторы обычно могут реплицироваться в организмах–хозяевах либо в виде эписом, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат селективные маркёры (например, резистентности к ампициллину, резистентности к гигромицину, резистентности к тетрациклину, резистентности к канамицину или резистентности к неомицину), позволяющие детектировать клетки, трансформируемые заданными ДНК–последовательностями.

Escherichia coli являются примером прокариотической клетки–хозяина, которую можно использовать для клонирования полинуклеотида, кодирующего антитело по соединению. Другие микроорганизмы–хозяева, пригодные для применения, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как сальмонеллы (*Salmonella*), серрации (*Serratia*) и различные виды псевдомонад (*Pseudomonas*). В этих прокариотических хозяевах также можно создавать экспрессионные векторы, которые обычно содержат регуляторные последовательности, отвечающие за экспрессию, совместимые с клеткой–хозяином (например, oriDжин репликации). Кроме того, может присутствовать некоторое количество различных известных промоторов, таких как промоторная система лактозы, промоторная система триптофана (*trp*), промоторная система бета-лактамазы или промоторная система фага лямбда. Промоторы обычно регулируют экспрессию (осуществляют контроль экспрессии), обычно с использованием

последовательности гена–оператора, и содержат последовательности сайта связывания рибосомы и т.п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции.

Также применимы для экспрессии другие микроорганизмы, например, дрожжи. *Saccharomyces* (например, *S. cerevisiae*) и *Pichia* являются примерами подходящих клеток дрожжей–хозяев, с соответствующими векторами, содержащими последовательности регуляции (контроля) экспрессии (например, промоторы), ориджин репликации, последовательности терминации и т.п., при необходимости. Типичные промоторы включают 3- фосфоглицерат–киназу и другие гликолитические ферменты. Индуцильные дрожжевые промоторы включают, наряду с другими, промоторы алкоголь дегидрогеназы, изоцитохром С и ферменты, отвечающие за утилизацию мальтозы и галактозы.

Помимо микроорганизмов для экспрессии и продуцирования антитела против Таубелка по настоящему изобретению (например, полинуклеотидов, кодирующих антитело к Tay) могут также применяться клетки млекопитающих (например, клетки млекопитающих, выращенные *in vitro* в клеточной культуре). См. Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Подходящие клетки хозяев–млекопитающих включают линии клеток СНО, различные Cos клеточные линии, клетки HeLa, клетки миеломных линий и трансформированные В-клетки или гибридомы. Экспрессионные векторы для этих клеток могут включать последовательности контроля экспрессии (регуляторные последовательности), такие как ориджин репликации, промотор и энхансер (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), и сайты необходимой информации для процессирования, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты аденилирования и последовательности терминации транскрипции. Примерами соответствующих регуляторных последовательностей являются промоторы генов иммуноглобулинов, SV40, аденоизвестного вируса, вируса бычьей папилломы, цитомегаловируса и т.п. См. Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

Будучи синтезированы (либо химическим методом, либо методом рекомбинантной ДНК), целые антитела, их димеры, отдельные лёгкие и тяжёлые цепи или другие формы антитела по изобретению (например, scFv и т.д.) могут быть очищены стандартными методами, известными из уровня техники, включая преципитацию сульфатом аммония, на колонках для аффинной хроматографии, колоночной хроматографией, высокоэффективной жидкостной хроматографией (HPLC, ВЭЖХ), электрофорезом в геле и т.п. (см. в целом Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Антитело по изобретению может быть практически (по существу) чистым, например, по меньшей мере чистым на 80%–85%, чистым по меньшей мере примерно на 85%–90%, чистым по

меньшей мере примерно на 90%–95% или на 98%–99% или выше, например, не содержать примесей, таких как клеточный дебрис, макромолекулы, отличные от антитела по изобретению, и т.д.

Композиции

В настоящем изобретении предусматривается композиция, содержащая антитело по изобретению. Композиция на основе антитела по изобретению может содержать, помимо антитела по изобретению, одно или более веществ, выбранных из группы, включающей: соль, например, NaCl, MgCl₂, KCl, MgSO₄ и т.д.; буферный агент, например, Трис(Tris)-буфер, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновую кислоту) (HEPES), 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), натриевую соль 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), 3-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MOPS), N-трис[гидроксиметил]метил-3-аминопропансульфоновую кислоту (TAPS) и т.д.; солюбилизирующий агент; детергент (ПАВ), например, неионное ПАВ, такое как Твин-20, и т.д.; ингибитор протеазы; глицерин; и т.п.

Нуклеиновые кислоты, экспрессионные векторы и клетки-хозяева

В настоящем изобретении предусматриваются нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело к Tay по изобретению.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к Tay по изобретению, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область лёгкой цепи и по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентичную нуклеотидной последовательности, изображённой на Фигуре 1В и представленной в SEQ ID NO:17.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к Tay по изобретению, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжёлой цепи и по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентичную нуклеотидной последовательности, изображённой на Фигуре 1А и представленной в SEQ ID NO:18.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к Tay по изобретению, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область лёгкой цепи и по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентичную нуклеотидной последовательности, изображённой на Фигуре 2В и представленной в SEQ ID NO:19.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к Tay по изобретению, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжёлой цепи и по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентичную нуклеотидной последовательности, изображённой на Фигуре 2А и представленной в SEQ ID NO:20.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело по изобретению, может быть функционально связана с одним или более регуляторных элементов, таких как промотор и энхансер, которые способствуют экспрессии нуклеотидной последовательности в предполагаемых клетках–хозяевах (например, в клетке, которая генетически модифицирована с возможностью синтеза кодированного антитела).

Подходящие промоторные и энхансерные элементы известны в уровне техники. Промоторы, подходящие для экспрессии в бактериальной клетке, включают, но без ограничения, lacI, lacZ, T3, T7, gpt, лямбда Р и trc. Промоторы, подходящие для экспрессии в эукариотической клетке, включают, но без ограничения, промоторные и энхансерные элементы генов лёгкой и/или тяжёлой цепей иммуноглобулинов; промотор предранних генов цитомегаловируса; тимидин–киназу вируса простого герпеса; ранний и поздний промоторы вируса SV40; промотор в длинных концевых повторах ретровируса; промотор мышиного гена металлотионеина-I; и различные тканеспецифические промоторы, известные в уровне техники.

Согласно некоторым вариантам для экспрессии, например, в клетке дрожжей подходящим промотором является конститutivoный промотор, например, такой как ADH1 промотор, PGK1 промотор, ENO промотор, PYK1 промотор и т.п.; или индуцибельные промоторы, например, такие как GAL1 промотор, GAL10 промотор, ADH2 промотор, PHO5 промотор, CUP1 промотор, GAL7 промотор, MET25 промотор, MET3 промотор, CYC1 промотор, HIS3 промотор, ADH1 промотор, PGK промотор, GAPDH промотор, ADC1 промотор, TRP1 промотор, URA3 промотор, LEU2 промотор, ENO промотор, TP1 промотор и AOX1 промотор (например, для применения в *Pichia*). Отбор подходящего вектора и промотора находится в компетенции рядового специалиста в данной области техники.

Промоторы, подходящие для применения в прокариотических клетках–хозяевах, включают, но без ограничения, промотор РНК полимеразы бактериофага T7; trp промотор; промотор lac оперона; гибридный промотор, например, гибридный промотор lac/tac, гибридный промотор tac/trc, промотор trp/lac, T7/lac промотор; trc промотор; tac промотор и т.п.; araBAD промотор; *in vivo* регулируемые промоторы, например, такие как ssaG промотор или родственный промотор (см., например, опубликованную заявку на патент США № 20040131637), pagC промотор (Pulkkinen and Miller, *J. Bacteriol.*, 1991: 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda et al., *PNAS*, 1992; 89(21): 10079-83), nirB промотор (Harborne et al. (1992) *Mol. Micro.* 6:2805-2813) и т.п. (см., например, Dunstan et al. (1999)

Infect. Immun. 67:5133-5141; McKelvie et al. (2004) *Vaccine* 22:3243-3255; и Chatfield et al. (1992) *Biotechnol.* 10:888-892); промотор сигма70, например, консенсусный промотор сигма70 (см., например, код доступа в GenBank № AX798980, AX798961 и AX798183); промотор стационарной фазы, например, *dps* промотор, *spv* промотор и т.п.; промотор из острова патогенности SPI-2 (см., например, Международную заявку WO96/17951); *actA* промотор (см., например, Shetron-Rama et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:1087-1096); *rpsM* промотор (см., например, Valdivia and Falkow (1996). *Mol. Microbiol.* 22:367); *tet* промотор (см., например, Hillen,W. and Wissmann,A. (1989) B Saenger,W. and Heinemann,U. (eds), в издании *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein–Nucleic Acid Interaction.* Macmillan, London, UK, Vol. 10, pp. 143–162); SP6 промотор (см., например, Melton et al. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:7035); и т.п.. Подходящие сильные промоторы для применения в клетках прокариот, например, таких как *Escherichia coli*, включают, но без ограничения, *Trc*, *Tac*, *T5*, *T7* и P_{Lambda} . Неограничивающие примеры операторов для применения в бактериальных клетках-хозяевах включают оператор и промотор лактозного оперона (репрессорный белок LacI меняет конформацию при контакте с лактозой, тем самым предупреждается связывание репрессорного белка LacI с оператором), промотор и оператор в триптофановом опероне (при образования комплекса с триптофаном репрессорный белок TrpR находится в конформации, которая связывается с оператором; в отсутствие триптофана репрессорный белок TrpR находится в конформации, которая не связывается с оператором), и tac промотор и оператор (см., например, deBoer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело по изобретению, может входить в состав экспрессионного вектора и/или клонирующего вектора. Если антитело по изобретению содержит два отдельных полипептида, нуклеотидные последовательности, кодирующие эти два полипептида, можно клонировать в одном и том же векторе или в раздельных векторах. Экспрессионный вектор может включать селективный маркер, ориджин репликации и другие компоненты, которые обеспечивают репликацию и/или сохранение вектора.

Специалистам в данной области техники известно множество подходящих векторов; многие из них имеются в продаже и пригодны для создания рекомбинантных конструкций по изобретению. Нижеуказанные векторы приводятся в качестве примера. Бактериальные: pBs, векторы PhageScript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia).

Экспрессионные векторы обычно имеют подходящие сайты рестрикции, локализованные близ промоторной последовательности, для того, чтобы обеспечить инсерцию нуклеотидных последовательностей, кодирующих гетерологичные белки. Может присутствовать селективный маркер, работающий (функциональный) в хозяине. Подходящие экспрессионные векторы включают, но без ограничения, вирусные векторы (например, вирусные векторы на основе вируса коровьей оспы (вакцинии); полиовируса; аденоовируса (см., например, Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borras et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088 1097, 1999; Международные заявки WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 и WO 95/00655); на основе аденоассоциированного вируса (см., например, Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998, Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997, Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591 594, 1996; Srivastava в Международной заявке WO 93/09239, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154-165; и Flotte et al., PNAS (1993) 90:10613-10617); SV40; на основе вируса простого герпеса; вируса иммунодефицита человека (см., например, Miyoshi et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812 7816, 1999); ретровирусный вектор (например, на основе вируса мышного лейкоза, вируса некроза селезёнки, и векторы на основе ретровирусов, например, таких как вирус саркомы Payса, вирус саркомы мышей Харви, вирус лейкоза птиц, вирус иммунодефицита человека, вирус миелопролиферативной саркомы и вирус опухоли молочной железы); и т.п.

Как отмечалось выше, нуклеиновая кислота по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело по изобретению. Нуклеиновая кислота по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую участки CDR тяжёлой и лёгкой цепей антитела IPN001. Согласно некоторым вариантам нуклеиновая кислота по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую участки CDR тяжёлой и лёгкой цепей антитела IPN002, причём последовательности, кодирующие CDR, перемежаются с FR-кодирующими нуклеотидными последовательностями. Согласно некоторым вариантам FR-кодирующие нуклеотидные последовательности представляют собой человеческие FR-кодирующие нуклеотидные последовательности.

Клетки–хозяева

В настоящем изобретении предусматриваются выделенные генетически модифицированные клетки–хозяева (например, *in vitro* клетки), которые были генетически

модифицированы с помощью нуклеиновой кислоты по изобретению. Согласно некоторым вариантам выделенная генетически модифицированная клетка–хозяин может продуцировать антитело по изобретению.

Подходящие клетки-хозяева включают эукариотические клетки-хозяева, такие как клетка млекопитающего, клетка хозяина–насекомого, клетка дрожжей; и прокариотические клетки, например, такие как бактериальные клетки. Введение нуклеиновой кислоты по изобретению в клетку–хозяина можно осуществлять, например, преципитацией фосфатом кальция, трансфекцией, опосредуемой DEAE–декстраном, трансфекцией, опосредуемой липосомами, электропорацией или другим известным методом.

Подходящие клетки млекопитающих включают первичные клетки и иммортилизованные (“бессмертные”) клеточные линии. Применимые клеточные линии млекопитающих включают человеческие клеточные линии, клеточные линии нечеловеческих приматов, клеточные линии грызунов (например, мыши, крысы) и т.п. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают, но без ограничения, клетки HeLa (например, клетки из Американской коллекции типовых культур (ATCC) No. CCL-2), клетки CHO (например, ATCC No. CRL9618, CCL61, CRL9096), клетки 293 (например, ATCC No. CRL-1573), клетки Vero, клетки NIH 3T3 (например, ATCC No. CRL-1658), клетки HuH-7, клетки BHK (например, ATCC No. CCL10), клетки PC12 (ATCC No. CRL1721), клетки COS, клетки COS-7 (ATCC No. CRL1651), клетки RAT1, мышиные L клетки (ATCC No. CCL1.3), человеческие эмбриональные клетки почек (HEK) (ATCC No. CRL1573), клетки HLHepG2 и т.п. В некоторых случаях клетки представляют собой HEK клетки. В некоторых случаях клетки представляют собой CHO клетки, например, CHO-K1 клетки (ATCC No. CCL-61), CHO-M клетки, CHO-DG44 клетки (ATCC No. PTA-3356) и т.п.

Подходящие клетки дрожжей включают, но без ограничения, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces* sp., *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp., *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Neurospora crassa*, *Chlamydomonas reinhardtii*, и т.п.

Подходящие прокариотические клетки включают, но без ограничения, любые из множества лабораторных штаммов *Escherichia coli*, *Lactobacillus* sp. и т.п. См., например,

Carrier et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1176-1181; патент США № 6,447,784; и Sizemore et al. (1995) *Science* 270:299-302. Как правило, лабораторный штамм не является патогенным. Неограничивающие примеры других применимых бактерий включают, но без ограничения, *Bacillus subtilis* и т.п. Согласно некоторым вариантам клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli*.

Фармацевтические композиции

В настоящем изобретении предусматриваются композиции, включающие антитело по изобретению. Обычно композиция содержит эффективное количество антитела. Выражение “эффективное количество” означает дозу, достаточную для достижения нужного результата, например, ослабление неблагоприятного симптома, ассоциированного с таупатией, ослабление симптома таупатии, замедление прогрессирования таупатии и т.д. Как правило, нужный результат представляет собой по меньшей мере ослабление симптома таупатии по сравнению с контролем. Антитело по изобретению можно доставлять таким образом, чтобы обойти гематоэнцефалический барьер, как подробнее описано ниже. Антитело по изобретению можно приготовить и/или модифицировать таким образом, чтобы обеспечить его транспорт через гематоэнцефалический барьер.

В настоящем изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая: а) антитело, которое специфически связывает эпитоп на N-концевом участке Тау-белка, причём это антитело содержит: (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; (iv) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (v) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (vi) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12; и б) фармацевтически приемлемый эксципиент, применимый для введения человеку, при этом композиция не содержит эндотоксинов.

В настоящем изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая: а) выделенное гуманизированное моноклональное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида; и б) фармацевтически приемлемый эксципиент, причём согласно некоторым вариантам фармацевтически приемлемый эксципиент применим для введения человеку.

В настоящем изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая: А) выделенное антитело, содержащее гуманизированную каркасную область лёгкой цепи; и гуманизированную каркасную область тяжёлой цепи, при этом выделенное антитело конкурирует за связывание с эпитопом на N-концевом участке Тау-полипептида с антителом, которое содержит: а) область лёгкой цепи, включающую: (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и б) область тяжёлой цепи, включающую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12; и В) фармацевтически приемлемый эксципиент, причём согласно некоторым вариантам фармацевтически приемлемый эксципиент применим для введения человеку.

В настоящем изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая: А) выделенное антитело, которое представляет собой Fv, scFv, Fab, F(ab')2 или Fab', и которое конкурирует за связывание с эпитопом на N-концевом участке Тау-полипептида с антителом, которое содержит: а) область лёгкой цепи, включающую: (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и б) область тяжёлой цепи, включающую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12; и В) фармацевтически приемлемый эксципиент, причём согласно некоторым вариантам фармацевтически приемлемый эксципиент применим для введения человеку.

В настоящем изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая: А) выделенное антитело, причём это выделенное антитело содержит константную область человеческой лёгкой цепи и константную область человеческой тяжёлой цепи, и это выделенное антитело конкурирует за связывание с эпитопом на N-концевом участке Тау- полипептида с антителом, которое содержит: а) область лёгкой цепи, включающую: (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:9; и b) область тяжёлой цепи, включающую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:12; и В) фармацевтически приемлемый эксципиент, причём согласно некоторым вариантам фармацевтически приемлемый эксципиент применим для введения человеку.

Композиции

В способах по изобретению антитело по изобретению можно вводить хозяину любым обычным методом, который обуславливает нужный терапевтический эффект или диагностический эффект. Таким образом агент можно включать в различные композиции для терапевтического применения. Более конкретно, антитело по изобретению можно приготовить в виде фармацевтической композиции, смешивая с соответствующими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, и можно приготовить в виде препаратов в твёрдом, полутвёрдом, жидким или газообразном виде, например, в виде таблеток, капсул, порошков, гранул, мазей, растворов, суппозиториев, препаратов для инъекций, средств, применяемых при ингаляции, и аэрозолей.

В фармацевтических лекарственных формах антитело по изобретению можно вводить в виде его фармацевтически приемлемой соли, или его можно вводить самостоятельно или его можно вводить в виде ассоциата (конъюгата) или в виде комбинации с другими фармацевтически активными соединениями. Нижеприведённые методы и эксперименты даются лишь в качестве примеров, но ни в коем случае не для ограничения.

Для пероральных препаратов антитело по изобретению можно применять самостоятельно или в комбинации с походящими добавками для приготовления таблеток, порошков, гранул или капсул, например, с обычными добавками, такими как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; со связующими веществами, такими как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин; с разрыхлителем (веществом, способствующим распаду), таким как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или натрий–карбоксиметилцеллюлоза; со смазывающими веществами, такими как тальк или стеарат

магния; и, при необходимости, с разбавителями, буферными агентами, увлажняющими агентами, консервантами и вкусоарomaticкими веществами.

Антитело по изобретению можно приготовить в виде препаратов для инъекции путём их растворения, суспензирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоль; при необходимости, с обычными добавками, такими как солюбилизирующие вещества, изотонические агенты, суспенсирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты.

Фармацевтические композиции, содержащие антитело по изобретению, готовят, смешивая антитело нужной степени чистоты с необязательными физиологически активными носителями, эксципиентами, стабилизирующими веществами, ПАВ, буферами и/или веществами, регулирующими тоничность. Приемлемые носители, эксципиенты и/или стабилизирующие агенты являются нетоксическими для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы других органических кислот; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту, глутатион, цистеин, метионин и лимонную кислоту; консерванты (такие как этанол, бензиловый спирт, фенол, м-крезол, п-хлор-м-крезол, метил- или пропилпараabenы, бензалкония хлорид или их комбинации); аминокислоты, такие как аргинин, глицин, орнитин, лизин, гистидин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, изолейцин, лейцин, аланин, фенилаланин, тирозин, триптофан, метионин, серин, пролин и их комбинации; моносахарины, дисахарины и другие углеводы; низкомолекулярные (содержащие менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как желатин или сывороточный альбумин; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как трегалоза, сахароза, лактоза, глюкоза, манноза, мальтоза, галактоза, фруктоза, сорбоза, раф(ф)иноза, глюказамин, N-метилглюказамин, галактозамин и нейраминовая кислота; и/или неионные ПАВ, такие как Твин, Бридж (Brj), Плюроники, Тритон-Х или полиэтиленгликоль (PEG, ПЭГ).

Фармацевтические композиции могут быть в жидкой форме, в лиофилизированной форме или в жидкой форме, восстановленной из лиофилизированной формы, при этом лиофилизованный препарат следует восстанавливать стерильным раствором перед применением. Стандартная процедура восстановления лиофилизированной композиции состоит в том, чтобы добавить к нему некоторое количество чистой воды (обычно эквивалентное объёму, удалённому в процессе лиофилизации); впрочем растворы, содержащие антибактериальные агенты, можно применять для получения

фармацевтических композиций для парентерального введения; см. также Chen (1992) Drug Dev Ind Pharm 18, 1311-54.

Типичные концентрации антител в фармацевтической композиции по изобретению могут составлять от примерно 1 мг/мл до примерно 200 мг/мл или от примерно 50 мг/мл до примерно 200 мг/мл или от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл.

Водную композицию антитела можно приготовить в буферном растворе с определённым pH, например, pH в интервале от примерно 4.0 до примерно 7.0, или от примерно 5.0 до примерно 6.0 или же примерно при 5.5. Примеры буферов с pH в этих пределах включают фосфатный, гистидиновый, цитратный, сукцинатный, ацетатный буферы и буферы на основе других органических кислот. Концентрация буфера может составлять от примерно 1 mM до примерно 100 mM или от примерно 5 mM до примерно 50 mM, в зависимости, например, от буфера и нужной тоничности препарата.

Регулятор тоничности (тонический агент) можно включать в композицию антитела, чтобы модулировать тоничность композиции. Типичные регуляторы тоничности включают хлорид натрия, хлорид калия, глицерин и любой компонент из группы аминокислот, сахара, а также их комбинации. Согласно некоторым вариантам водная композиция является изотонической, хотя могут применяться гипертонические или гипотонические растворы. Термин "изотонический" означает раствор, имеющий ту же тоничность, что и другой раствор, с которым данный раствор сравнивается, такой как физиологический раствор или сыворотка. Регуляторы тоничности могут применяться в количестве от примерно 5 mM до примерно 350 mM, например, в количестве от 100 mM до 350 mM.

ПАВ также можно добавлять в композицию антитела, чтобы уменьшить агрегацию (укрупнение) антитела в составе композиции, и/или минимизировать образование макрочастиц в композиции, и/или уменьшить адсорбцию. Примеры ПАВ включают эфиры полиоксиэтиленсorbitана и жирных кислот (Tween, твины), полиоксиэтиленалкиловые эфиры (Brij), алкилфенилполиоксиэтиленалкиловые эфиры (Triton-X), сополимер полиоксиэтилена с полиоксипропиленом (Poloxamer, Pluronic, полоксамер, плюроник) и додецилсульфат натрия (SDS). Примерами подходящих эфиров полиоксиэтиленсorbitана и жирных кислот являются Полисорбат 20 (продаляемый под товарным знаком Tween 20TM) и полисорбат 80 (продаляемый под товарным знаком Tween 80TM). Примерами соответствующих сополимеров полиоксиэтилена с полиоксипропиленом являются сополимеры, продаваемые под названиями Pluronic® F68 или Poloxamer 188TM. Примерами подходящих полиоксиэтиленалкиловых эфиров

являются соединения, продаваемые под торговым знаком Brij™. Типичные концентрации ПАВ могут быть в интервале от примерно 0.001% до примерно 1% вес/об.

Можно также добавлять лиопротектор, чтобы защитить неустойчивый активный ингредиент (например, белок) в дестабилизирующих условиях в процессе лиофилизации. Известные лиопротекторы включают, например, сахара (включая глюкозу и сахарозу); полиолы (включая маннит, сорбит и глицерин); и аминокислоты (включая аланин, глицин и глутаминовую кислоту). Лиопротекторы можно включать в количестве примерно от 10 мМ до 500 нМ.

Согласно некоторым вариантам композиция по изобретению включает антитело по изобретению и один или более вышеуказанных агентов (например, ПАВ, буфер, стабилизирующее вещество, регулятор тоничности) и по существу не содержат один или более консервантов, таких как этанол, бензиловый спирт, фенол, м-крезол, п-хлор-м-крезол, метил- или пропилпарабены, бензалкония хлорид и их комбинации. Согласно другим вариантам консервант включён в состав композиции, например, в концентрациях в интервале от примерно 0.001 до примерно 2% (вес/об).

Например, композиция по изобретению может представлять собой жидкую или лиофилизированную композицию, применимую для парентерального введения, и может включать: от примерно 1 мг/мл до примерно 200 мг/мл антитела по изобретению; от примерно 0.001 % до примерно 1 % по меньшей мере одного ПАВ; от примерно 1 мМ до примерно 100 мМ буфера; необязательно, от примерно 10 мМ до примерно 500 мМ стабилизирующего вещества; и от примерно 5 мМ до примерно 305 мМ регулятора тоничности; и имеет pH от примерно 4.0 до примерно 7.0.

В другом примере композиция по изобретению для парентерального введения представляет собой жидкую или лиофилизированную композицию, содержащую: от примерно 1 мг/мл до примерно 200 мг/мл антитела по изобретению; 0.04% Tween 20 вес/об; 20 мМ L-гистидина; и 250 мМ сахарозы; и имеет pH 5.5.

В другом примере композиция по изобретению для парентерального введения представляет собой лиофилизированную композицию, содержащую: 1) 15 мг/мл антитела по изобретению; 0.04% вес/об Tween 20; 20 мМ L-гистидина; и 250 мМ сахарозы; и имеет pH 5.5; или 2) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.04% вес/об Tween 20; 20 мМ L-гистидина; и 250 мМ сахарозы; и имеет pH 5.5; или 3) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес/об Tween 20; 20 мМ L-гистидина; и 250 мМ сахарозы; и имеет pH 5.5; или 4) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.04% вес/об Tween 20; 20 мМ L-гистидина; и 250 мМ трегалозы; и имеет pH 5.5; или 6) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес/об Tween 20; 20 мМ L-гистидина; и 250 мМ трегалозы; и имеет pH 5.5.

В другом примере композиция по изобретению для парентерального введения представляет собой жидкую композицию, содержащую: 1) 7.5 мг/мл антитела по изобретению; 0.022% вес/об Tween 20; 120 mM L-гистидина; и 250 125 mM сахарозы; и имеет pH 5.5; или 2) 37.5 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес/об Tween 20; 10 mM L-гистидина; и 125 mM сахарозы; и имеет pH 5.5; или 3) 37.5 мг/мл антитела по изобретению; 0.01% вес/об Tween 20; 10 mM L-гистидина; и 125 mM сахарозы; и имеет pH 5.5; или 4) 37.5 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес/об Tween 20; 10 mM L-гистидина; 125 mM трегалозы; и имеет pH 5.5; или 5) 37.5 мг/мл антитела по изобретению; 0.01% вес/об Tween 20; 10 mM L-гистидина; и 125 mM трегалозы; и имеет pH 5.5; или 6) 5 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес/об Tween 20; 20 mM L-гистидина; и 250 mM трегалозы; и имеет pH 5.5; или 7) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес/об Tween 20; 20 mM L-гистидина; и 250 mM маннита; и имеет pH 5.5; или 8) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес/об Tween 20; 20 mM L-гистидина; и 140 mM хлорида натрия; и имеет pH 5.5; или 9) 150 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес/об Tween 20; 20 mM L-гистидина; и 250 mM трегалозы; и имеет pH 5.5; или 10) 150 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес/об Tween 20; 20 mM L-гистидина; и 250 mM маннита; и имеет pH 5.5; или 11) 150 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес/об Tween 20; 20 mM L-гистидина; и 140 mM хлорида натрия; и имеет pH 5.5; или 12) 10 мг/мл антитела по изобретению; 0.01% вес/об Tween 20; 20 mM L-гистидина; и 40 mM хлорида натрия; и имеет pH 5.5.

Антитело по изобретению можно применять в виде аэрозоля для ингаляции. Антитело по изобретению можно приготовить в виде вытесняемого пропеллента, например, такого как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п.

Кроме того, антитело по изобретению можно приготовить в виде суппозиториев, смешивая их с различными основами, например, с эмульгирующими основами или водорастворимыми основами. Антитело по изобретению можно вводить ректально в виде суппозитория. Суппозиторий может включать носители, такие как масло какао, карбоваксы и полиэтиленгликоли, которые плавятся при температуре тела, но отверждаются при комнатной температуре.

Стандартная лекарственная форма для перорального или ректального введения, например, такая как сиропы, эликсиры и суспензии, может предусматриваться в случае, когда каждая единица дозирования, например, чайная ложка, столовая ложка, таблетка или суппозиторий, содержит заданное количество композиции, содержащей один или более ингибиторов. Аналогично, стандартные (единичные) лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать заданное количество композиции

в виде раствора в стерильной воде, изотоническом растворе хлорида натрия или в другом фармацевтически приемлемом носителе.

Термин “стандартная (единичная) лекарственная форма” в данном контексте относится к физически дискретным единицам (элементам), применимым в качестве однократных доз для человека или животных, при этом каждая единица (элемент) содержит заданное количество антитела к Тау-белку по настоящему изобретению, рассчитанное как количество, достаточное для того, чтобы, совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем, вызвать нужный эффект. Индивидуальные характеристики антитела по изобретению могут зависеть от конкретного используемого антитела и от нужного ожидаемого эффекта и от фармакодинамики, обусловленной каждым антителом хозяина.

В способе по настоящему изобретению также находят применение другие методы введения. Например, антитело по изобретению можно приготовить в виде суппозиториев и, в некоторых случаях, в виде аэрозоля и интраназальной композиции. Для суппозиториев в состав наполнителя включает обычные связующие и носители, например, такие как полиалкиленгликоли и триглицериды. Такие суппозитории можно приготовить из смесей, содержащих активный ингредиент в концентрации от примерно 0.5% до примерно 10% (вес.), например, от примерно 1% до примерно 2%.

Интраназальные композиции обычно включают наполнители, которые не вызывают раздражения в слизистой носа и не нарушают цилиарной функции. Можно применять разбавители, например, такие как вода, водный раствор хлорида натрия или другие известные вещества. Композиции для назального применения могут содержать также консерванты, например, но без ограничения, такие как хлорбутанол и бензалкония хлорид. Может также присутствовать поверхностно-активное вещество (ПАВ) для повышения всасывания антитела по изобретению в слизистую оболочку носа.

Антитело по изобретению можно вводить в виде инъекций. Обычно композиции для инъекций готовят в виде жидких растворов или суспензий; также можно готовить твёрдые формы, пригодные для растворения или супспендиования в жидким носителях перед инъекцией. Препарат может также быть в виде эмульсии, или антитело может быть инкапсулировано в липосомы в качестве носителей.

Подходящими эксципиентами–наполнителями (носителями) являются, например, вода, раствор хлорида натрия, декстроза, глицерин, этанол и т.п. и их комбинации. Кроме того, при необходимости носитель (наполнитель) может содержать минорные количества вспомогательных веществ, например, таких как увлажняющие агенты или эмульгаторы или буферные агенты. Современные методы приготовления таких лекарственных форм

известны, или будут очевидны специалистам в данной области техники. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17th edition, 1985. Композиция или состав для введения в любом случае должен содержать некоторое количество антитела по изобретению, адекватное для достижения заданного состояния у пациента, проходящего лечение.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как наполнители, адьюванты, носители или разбавители, являются легкодоступными. Кроме того, общедоступными являются фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, например, такие как вещества, корректирующие pH, и буферизующие агенты, вещества, корректирующие тоничность, стабилизирующие вещества, увлажняющие вещества.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению готовят в виде препарата с контролируемым высвобождением. Препараты с контролируемым высвобождением можно приготовить методами, хорошо известными в уровне техники. Подходящие примеры препаратов с пролонгированным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твёрдых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, в котором матрицы находятся в виде изделий определённой формы, например, плёнок или микрокапсул. Примеры матриц с пролонгированным высвобождением включают сложные полиэфиры, сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамат, нерасщепляемый сополимер этилена с винилацетатом, гидрогели, полилактиды, расщепляемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота. Возможную потерю биологической активности и возможные изменения иммуногенности антител, содержащихся в препаратах с пролонгированным высвобождением, можно предупредить, используя соответствующие добавки, регулируя содержание влаги и разрабатывая специфические композиции полимерной матрицы.

Лекарственная форма с контролируемым высвобождением в объёме настоящего изобретения означает любую из лекарственных форм с замедленным высвобождением. Для целей настоящего описания нижеприведённые термины по существу эквивалентны контролируемому высвобождению: непрерывное высвобождение, контролируемое (регулируемое) непрерывное высвобождение, задержанное высвобождение, депо, постепенное высвобождение, долговременное высвобождение, запрограммированное высвобождение, пролонгированное высвобождение, пропорциональное высвобождение, отсроченное высвобождение, продлённого действия, высвобождение с задержкой, медленное высвобождение, высвобождение с интервалами, замедленное высвобождение, оболочка для высвобождения во времени, рассчитанное по времени высвобождение, замедленное действие, пролонгированное действие, многоуровневое (многослойное)

действие, продолжительное действие, повторное действие, медленное действие, замедленное действие, препараты с замедленным действием и с продлённым высвобождением. Более подробное обсуждение этих терминов можно найти в монографии Lesczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms, 1987 (CRC Press, Inc.).

Различные методы (технологии) контролируемого высвобождения охватывают широкий спектр лекарственных форм. Технологии контролируемого высвобождения включают, но без ограничения, физические и химические системы.

Физические системы включают, но без ограничения, резервуарные системы с мембранами, контролирующими скорость, такие как системы микроинкапсулации, и мембранные системы; резервуарные системы без мембран, контролирующих скорость, такие как пористое волокно, ультрамикропористый триацетат целлюлозы и пористые полимерные субстраты и пены; монолитные системы, включая “физические растворы” таких систем в непористых, полимерных или эластомерных матрицах (например, неэродиуемых, эродиуемых, под действием факторов окружающей среды, и деструктурируемых), и материалы, физически диспергированные в непористых, полимерных или эластомерных матрицах (например, неэродиуемых, эродиуемых, под действием факторов окружающей среды, и деструктурируемых); многослойные структуры, включая резервуарные слои, химически сходные или несходные с внешними контрольными слоями; и другие физические методы, такие как осмотические насосы или адсорбция на ионообменных смолах.

Химические системы включают, но без ограничения, химическую эрозию полимерных матриц (например, гетерогенную или гомогенную эрозию), или биологическую эрозию полимерных матриц (например, гетерогенную или гомогенную). Более подробное обсуждение классификации систем для контролируемого высвобождения можно найти в монографии Agis F. Kydonieus, Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications, 1980 (CRC Press, Inc.).

Существует ряд систем доставки лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением, которые разработаны для перорального введения. Эти системы включают, но без ограничения, осмотические желудочно-кишечные системы доставки с контролируемым осмотическим давлением; гидродинамические с контролируемым давлением желудочно-кишечные системы доставки; мембранные желудочно-кишечные системы доставки, которые включают устройства для желудочно-кишечной доставки с контролируемым проникновением через микропористую мембрану; устойчивые к желудочному соку нацеленные на кишечник желудочно-кишечные системы доставки с контролируемым высвобождением; гель-диффузионные желудочно-кишечные системы

доставки; и ионообменные желудочно-кишечные системы доставки, которые включают катионные и анионные лекарства. Дополнительную информацию относительно систем доставки лекарств с контролируемым высвобождением можно найти в монографии Yie W. Chien, Novel Drug Delivery Systems, 1992 (Marcel Dekker, Inc.).

Установление доз

Подходящие дозы может определить лечащий врач или другой квалифицированный медицинский персонал на основании различных клинических показателей. Как хорошо известно в медицине, дозы для любого пациента зависят от многих факторов, включая габариты пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение для введения, пол пациента, время и способ введения, общее состояние здоровья и другие лекарства, вводимые одновременно. Антитело по изобретению можно вводить в количествах от 1 нг/кг массы тела до 20 мг/кг массы тела, например, от 0.1 мг/кг массы тела до 10 мг/кг массы тела, например, от 0.5 мг/кг массы тела до 5 мг/кг массы тела; однако предусматриваются дозы ниже и выше этих приведённых в качестве примера доз, в особенности учитывая вышеприведённые факторы. Если схема представляет собой непрерывную инфузию, дозы также могут быть в интервале от 1 мкг до 10 мг на килограмм массы тела в минуту.

Специалисты в данной области легко поймут, что уровни доз могут меняться в зависимости от конкретного антитела, тяжести симптомов и чувствительности субъекта к побочным эффектам. Предпочтительные дозы для данного соединения может легко определить специалист в данной области различными методами.

Способы введения

Антитело по изобретению вводят субъекту любым подходящим методом и путём, применимым для доставки лекарства, включая методы *in vivo* и *ex vivo*, а также системные и локальные пути введения.

Обычные и фармацевтически приемлемые пути введения включают интраназальный, внутримышечный, интратрахеальный, интрапекальный (подболочечный), подкожный, интрадермальный, топический, внутривенный внутриартериальный, ректальный, назальный, пероральный и другие энтеральные и парентеральные пути введения. Пути введения можно, при необходимости, комбинировать или корректировать в зависимости от антитела и/или нужного эффекта. Антитело по изобретению можно вводить в виде однократной дозы или в виде многократных доз. Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят перорально. Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят в виде ингаляции. Согласно некоторым вариантам композицию

антитела по изобретению вводят интраназально. Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят местно (локально). Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят интракраниально. Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят внутривенно. Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят интрапекально.

Антитело по настоящему изобретению можно вводить хозяину любыми доступными обычными методами и путями, пригодными для доставки обычных лекарств, включая системные или локальные пути. В целом пути введения, рассматриваемые в изобретении, включают, но без ограничения, энтеральный, парентеральный пути или ингаляцию.

Парентеральные пути введения, отличные от ингаляции, включают, но без ограничения, топический, трансдермальный, подкожный, внутримышечный, внутриглазничный, интракапсулярный, внутрипозвоночный (интраспинальный), внутригрудинный, интрапекальный и внутривенный пути, т.е. любой путь введения, отличный от введения через пищевод. Парентеральное введение можно осуществлять для системной или локальной доставки антитела по изобретению. Если нужна системная доставка, введение обычно включает инвазивное введение или системное всасывание при топическом введении или введении фармацевтических препаратов через слизистую оболочку.

Антитело по изобретению можно также доставлять субъекту с помощью энтерального введения. Энтеральные пути введения включают, но без ограничения, пероральную и ректальную (например, с использованием суппозитория) доставку.

Под лечением (терапией) понимают по меньшей мере уменьшение интенсивности симптомов, обусловленных патологическим состоянием, причиняющим боль хозяину, причём уменьшение интенсивности понимают в широком смысле по отношению по меньшей мере к уменьшению величины показателя, например, симптома, обусловленного патологическим состоянием, лечение которого проводится, например, таупатией. Фактически лечение также включает ситуации, когда патологическое состояние, или по меньшей мере связанный с ним симптом, полностью ингибируются, например, предупреждается их наступление, или останавливаются, например, завершаются, так что хозяин больше не страдает от патологического состояния или по меньшей мере от симптомов, которые характеризуют патологическое состояние.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению вводят с помощью инъекции и/или доставки, например, в область артерии мозга или непосредственно в ткань

мозга. Антитело по изобретению можно также вводить непосредственно в целевую область, например, доставкой с помощью биолистики (биологической баллистики) в целевую область.

Различных хозяев (где термин “хозяин” употребляется взаимозаменяемо с терминами “субъект”, “индивидуум” и “пациент”) лечат согласно способам по изобретению. Обычно такие хозяева являются “млекопитающими”, причём этот термин применяется в широком смысле для описания организмов, которые относятся к классу млекопитающих, включая отряд хищных (например, собак и кошек), грызунов (например, мышей, морских свинок и крыс) и приматов (например, людей, шимпанзе и низших обезьян). Согласно некоторым вариантам хозяева являются людьми.

Предусматриваются наборы с разовыми дозами антитела по изобретению, например, в виде пероральных или инъецируемых доз. В таких наборах, помимо контейнеров, содержащих разовые дозы, находится информационный вкладыш в упаковку, в котором описывается применение и соответствующие преимущества антитела при лечении целевого патологического состояния. Предпочтительные соединения и разовые дозы описаны выше.

СПОСОБЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

В настоящем изобретении предусматриваются *in vitro* способы обнаружения Тау–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта; и способы обнаружения Тау–полипептида у живого субъекта *in vivo*. Способ по изобретению обнаружения *in vitro* может быть количественным. Следовательно, Тау–полипептид может служить в качестве биомаркера прогрессирования таупатии или отклика на лечение таупатии.

Детектируемый/количественно определяемый Тау–полипептид может представлять собой: а) полноразмерный Тау–полипептид; б) N–концевой фрагмент полноразмерного Тау–полипептида; с) тотальный Тау–полипептид, где “тотальный Тау–полипептид” может включать полноразмерный Тау–полипептид любой изоформы; д) свободный Тау–полипептид (“Tay”), например, Тау–полипептид (“Tay”), который не связан с антителом к “Tay”; и е) любые N–концевые фрагменты “Tay”, которые присутствуют в биологическом образце и которые выявляют эпитоп, узнаваемый антителом к “Tay” по изобретению. Аминокислотные последовательности человеческого полноразмерного “Tay”, представлены на Фигурах 6А-Д.

В ряде случаев метод обнаружения по изобретению может также включать определение уровня А β 40 и/или А β 42 в биологическом образце. Определение уровня А β 40 и/или А β 42 в биологическом образце можно осуществлять с помощью

иммунологического анализа (например, ELISA), например, с применением антитела, которое связывает А β 40 и/или А β 42.

Подходящие биологические образцы включают, например, спинномозговую жидкость (ликвор), кровь, плазму крови, сыворотку крови, мочу и слону.

In vitro метод обнаружения Тау–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта, по настоящему изобретению обычно включает: а) осуществление контакта биологического образца с антителом к “Тау” по настоящему описанию; и б) обнаружение связывания антитела к Тау–полипептиду, присутствующему в образце. В ряде случаев антитело к Тау содержит VH и/или VL CDR, изображённые на Фигурах 1А и 1В. В некоторых случаях антитело к Тау содержит VH и/или VL CDR, изображённые на Фигурах 2А и 2В.

Метод обнаружения по настоящему изобретению можно применять для того, чтобы определить, действительно ли у субъекта имеется таупатия или риск развития таупатии. Метод обнаружения по настоящему изобретению можно применять для определения стадии (тяжести) таупатии. Метод обнаружения по настоящему изобретению можно применять для определения отклика пациента на схему лечения таупатии. Биологический образец можно тестировать, применяя метод обнаружения по изобретению, причём биологический образец получают от субъекта с подозрением на таупатию, от субъекта, у которого была диагностирована таупатия, у субъекта с генетической предрасположенностью к развитию таупатии, и т.д.

В настоящем изобретении предусматривается способ диагностики нейродегенеративной таупатии у субъекта. Этот способ обычно включает (а) определение уровня Тау–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта; и (б) сравнение уровня Тау–полипептида с эталоном, стандартом или нормальным контрольным значением, которое показывает уровень Тау–полипептида у здоровых контрольных субъектов. Заметная разница между уровнем Тау–полипептида в биологическом образце и нормальным контрольным значением указывает на наличие нейродегенеративной таупатии у субъекта.

В настоящем изобретении предусматривается способ мониторинга прогрессирования или мониторинга реакции на лечение нейродегенеративной таупатии у субъекта. Способ обычно включает сравнение уровня Тау–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта в первой временной точке, с уровнем Тау–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта во второй временной точке. Разница между уровнем Тау–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта во второй временной точке, и уровнем Тау–полипептида в биологическом образце,

полученном от субъекта в первой временнóй точке, может отвечать на вопрос: i) прогрессирует ли таупатия или прогрессирование заболевания остановлено; и/или ii) с какой скоростью прогрессирует таупатия; и/или iii) наблюдается ли у пациента положительный клинический ответ на терапию с помощью лекарственного средства или с помощью другой схемы лечения таупатии.

В настоящем изобретении предусматривается способ определения стадии таупатии. Например, способ по изобретению может предусматривать определение стадии болезни Альцгеймера. Например, уровень Тау–полипептида в биологическом образце (например, в CSF (ликворе) или другом биологическом образце) от живого субъекта может служить указанием на стадию AD по Braak (Braak and Braak (1995) *Neurobiol. Aging* 16:271). Например, уровень Тау–полипептида в биологическом образце от живого субъекта может указывать на стадию AD у субъекта: трансэнторинальные стадии I-II AD; лимбические стадии III-IV AD; или неокортикальные стадии V-VI AD.

Уровень Тау–полипептида в биологическом образце можно определять любым подходящим способом, известным в уровне техники. Подходящие способы включают, но без ограничения, белковый (“Вестерн”) blotting, иммунопреципитацию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA, РИА), сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS), двумерный гель–электрофорез, масс–спектроскопию (MS), времяпролётную MS с лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF), времяпролётную усиленную поверхностью лазерную десорбцию/ионизацию (SELDI-TOF), высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC, ВЭЖХ), жидкостную экспресс–хроматографию белков (FPLC), многомерную жидкостную хроматографию (LC) с последующей tandemной масс–спектрометрией (MS/MS) и лазерную денситометрию.

В настоящем изобретении предусматривается способ мониторинга прогрессирования таупатии у субъекта, который обычно включает: а) определение первого уровня Тау–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта в первой временнóй точке; б) определение второго уровня Тау–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта во второй временнóй точке; и с) сравнение второго уровня “Tay” с первым уровнем “Tay”. Стадии определения могут включать: i) осуществление контакта биологического образца с антителом к “Tay” по изобретению; и ii) количественное определение связывания антитела с Тау–полипептидом, присутствующим в образце.

В некоторых случаях первая временнáя точка представляет собой временнúю точку перед началом применения схемы лечения, а вторая временнáя точка представляет собой

временнóю точку после начала применения схемы лечения. Таким образом, в настоящем изобретении предусматривается способ мониторинга отклика на терапию с помощью агента, который лечит таупатию, причём этот способ включает: а) определение первого уровня Тау–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта в первой временнóй точке, т.е. перед началом терапии с помощью агента для лечения таупатии; б) определение второго уровня Тау–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта во второй временнóй точке, т.е. после начала терапии с помощью агента для лечения таупатии; и с) сравнение второго уровня “Тау” с первым уровнем “Тау”.

Способ мониторинга прогрессирования таупатии по изобретению можно применять для мониторинга прогрессирования синуклеинопатии, например, болезни Паркинсона (PD); деменции с тельцами Леви (DLB); множественной системной атрофии (MSA); и т.д. Например, мониторинг (контроль) прогрессирования PD с деменцией (PDD) можно осуществлять способом по изобретению.

При некоторых таупатиях уровень “Тау” повышается по мере прогрессирования заболевания. При других таупатиях уровень “Тау” понижается по мере прогрессирования заболевания. Так например, уровень “Тау” повышается по мере прогрессирования AD; и понижается по мере прогрессирования FTD.

Способ по изобретению может включать применение набора или устройства для анализа, содержащего антитело к Тау по изобретению. В настоящем изобретении предусматривается набор и устройства для анализа для осуществления способа, описанного в настоящей заявке. Набор по изобретению включает антитело к Тау по настоящему описанию.

Антитело к Тау может быть иммобилизовано на нерастворимом носителе (например, на тест–полоске, лунке многолуночного планшета, грануле (например, магнитной грануле, шарике) и т.д.). Подходящие носители хорошо известны и включают, наряду с прочими, коммерчески доступные материалы для колонок (насадки), полистирольные гранулы (шарики), латексные гранулы, магнитные гранулы, коллоидные частицы металлов, стеклянные и/или силиконовые чипы и поверхности, нитроцеллюлозные полоски, нейлоновые мембранны, листы, лунки реакционных планшетов (например, многолуночных планшетов), пластиковые трубки и т.д. Твёрдый носитель может содержать любое из множества веществ, включая, например, стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозу, натуральную и модифицированную целлюлозу, полиакриламиды, агарозу и магнетит. Соответствующие методы иммобилизации антитела по изобретению на твёрдом носителе хорошо известны и включают, но без ограничения, ионное,

гидрофобное, ковалентное взаимодействие и т.п. Твёрдые носители могут быть растворимыми или нерастворимыми, например, в водном растворе. Согласно некоторым вариантам соответствующий твёрдый носитель обычно нерастворим в водном растворе.

Антитело к Tay по настоящему изобретению может содержать детектируемую метку. Если антитело содержит детектируемую метку, набор по изобретению может включать один или более реагентов для обнаружения (проявления) детектируемой метки. Меченое антитело может включать метку, например, хемилюминесцентный агент, частицу, колориметрический агент, агент для переноса энергии, фермент, флуоресцентный агент или радиоизотоп. Подходящие детектируемые метки включают любую композицию, детектируемую (обнаруживаемую) спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунохимическими, электрическими, оптическими или химическими методами. Подходящие детектируемые метки включают, но без ограничения, флуоресцентные метки (например, флуоресцеин изотиоцианат, техасский красный, родамин, зелёный флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, жёлтый флуоресцентный белок и т.п.); радиоизотопные метки (например, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^{32}P); ферменты (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, люциферазу и другие ферменты, которые действуют на субстрат, давая продукт, который можно обнаружить флуорометрическим, колориметрическим или спектрофотометрическим методом).

Набор по изобретению может также включать один или более других, дополнительных компонентов, где дополнительные компоненты включают: 1) положительный контроль; 2) буфер (например, буфер для связывания; буфер для отмывки; и т.д.); 3) реагенты для генерирования детектируемого сигнала и т.п. Другие необязательные компоненты набора включают: ингибитор протеазы; детектируемую метку; и т.д. Различные компоненты набора могут находиться в отдельных контейнерах, или, при необходимости, некоторые совместимые компоненты могут быть предварительно объединены в одном контейнере.

Помимо вышеуказанных компонентов набор по изобретению может включать инструкции по применению компонентов набора для осуществления способа изобретения на практике. Инструкции для практического осуществления способа по изобретению обычно записаны на подходящем носителе информации. Например, инструкции могут быть напечатаны на носителе, таком как бумага или пластик и т.д. В этом случае инструкции могут находиться в наборе в виде вкладыша в упаковку, этикетки на контейнере, входящем в набор или его компоненты (т.е. связанные с упаковкой или субупаковкой (внутренней упаковкой)) и т.д. Согласно другим вариантам инструкции

находятся в виде файла электронных документов в базе данных на соответствующем машиночитаемом носителе информации, например, в виде постоянной памяти на компакт–диске (CD-ROM), на цифровом универсальном диске (DVD), на дискете и т.д. Согласно другим вариантам действительные инструкции отсутствуют в наборе, но предусматривается способ получения инструкций из удалённого источника, например, по Интернету. Примером такого варианта является набор, который включает web–адрес, где можно изучить инструкции и/или где можно скачать (загрузить) эти инструкции. Как и в случае инструкций, этот способ получения инструкций доступен на соответствующем носителе.

Устройство для анализа может включать антитело к Tau, иммобилизованное на твёрдом субстрате. Устройство для анализа может быть в любом из множества форматов, например, в виде тест–полоски, индикаторной полоски; и т.д.

In vivo визуализация

Как обсуждается выше, в настоящем изобретении предусматриваются способы обнаружения Tau–полипептида в организме живого субъекта, например, методом *in vivo* визуализации. Например, согласно одному варианту *in vivo* визуализацию Tau–полипептида можно осуществлять методами позитронно–эмиссионной томографии (PET, ПЭТ), однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT), оптической визуализации в ближней инфракрасной области спектра (NIR, НИР) или магнито–резонансной томографии (MRI). Антитело к Tau по изобретению вводят субъекту и детектируют присутствие и/или уровень Tau–полипептида. Антитело к Tau может включать метку, пригодную для применения в PET, SPECT, NIR или MRI. Такие метки включают контрастный агент или радиоизотоп, причём контрастный агент или радиоизотоп представляет собой такой контрастный агент или радиоизотоп, который пригоден для применения при визуализации, например, в способах визуализации на людях, описанных выше. В некоторых случаях антитело к Tau содержит VH и/или VL CDR участки антитела IPN001. В некоторых случаях антитело к Tau содержит VH и/или VL CDR участки антитела IPN002. Антитело к Tau может содержать одну или более гуманизированных каркасных областей, описанных выше.

Подготовка отчёта

В некоторых примерах способ обнаружения по изобретению включает обнаружение Tau–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта; и, с учётом уровня детектированного Tau–полипептида, создание отчёта и/или руководства по терапии или тактике ведения субъекта, от которого был получен биологический образец.

Отчёт может включать показание касательно вероятности таупатии у субъекта; показание касательно тяжести таупатии; показание касательно того, наблюдается ли у субъекта положительный клинический отклик на лечение таупатии; и т.п.

Так, отчёт может включать информацию, например, такую как прогнозируемая вероятность того, что у субъекта наблюдается, или обнаружится таупатия; рекомендации, относящиеся к последующему обследованию; рекомендация, касающаяся воздействия терапевтического лекарственного средства и/или других способов поддержания здоровья.

Например, способы по настоящему изобретению могут также включать стадию подготовки или выдачи отчёта, в котором представлены результаты обследования субъекта, причём этот отчёт может быть представлен в виде информации на электронных носителях (например, в виде информации на мониторе компьютера) или на материальных носителях (например, отчёт, напечатанный на бумаге или на другом материальном носителе). Оценка вероятности того, что у человека наблюдается таупатия или риск развития таупатии, может именоваться “отчёт о риске”, “степень риска” или “оценка (степень) правдоподобия (вероятности)”. Человек или организация, которые готовят отчёт (“генератор отчёта”), может также осуществлять такие меры, как сбор образцов, обработку образцов и т.п. Или же другая организация, а не генератор отчёта может осуществлять такие меры, как сбор образцов, обработку образцов и т.п. Отчёт об оценке степени риска может быть предоставлен пользователю. “Пользователь” может быть медицинским работником (например, клиницистом, врачом–лаборантом или терапевтом).

Меры по поддержанию здоровья

В некоторых примерах способ обнаружения по изобретению включает детектирование Тау–полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта; и на основании полученного уровня Тау–полипептида составление отчёта и/или руководства по терапии или мерам для поддержания здоровья субъекта, от которого получен биологический образец.

Так, например, в зависимости от результатов, полученных при осуществлении способа по изобретению, может быть указано, что субъекту рекомендуется терапевтическое вмешательство (лечение) по поводу таупатии и/или что следует рассмотреть специальные меры по поддержанию здоровья субъекта.

Терапевтическое вмешательство (воздействие) может включать, например, лекарственную терапию для лечения болезни Альцгеймера. Примеры лекарственной терапии для лечения болезни Альцгеймера включают, но без ограничения, ингибиторы ацетилхолинэстеразы, включая, но без ограничения, арисепт (донепезил), экселон (ривастигмин), метрифонат и такрин (когнекс); антитело к Аβ (например, соланезумаб);

антитело к Tay; нестероидные противовоспалительные агенты, включая, но без ограничения, ибупрофен и индометацин; ингибиторы циклооксигеназы-2 (Cox2), такие как Целебрекс; и ингибиторы моноамин оксидазы, например, такие как селегилен (элдеприл или депренил). Дозировки каждого из вышеуказанных агентов известны в уровне техники. Например, арисепт можно вводить в дозировке 50 мг в день перорально в течение 6 недель, затем, в случае хорошей переносимости субъектом, по 10 мг в день.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА СВОБОДНОГО И СВЯЗАННОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО ТАУ

После введения субъекту антитела к eTau (внеклеточного “Tau”) может показаться интересным определить количество eTau, оставшегося в CSF или ISF, которое не связано с антителом к eTau. В настоящем изобретении предусматриваются способы определения количества такого свободного eTau. Схематическое изображение способа определения количества eTau, остающегося в CSF или ISF, не связанного с антителом к eTau, дано на Фигуре 54А. После введения субъекту антитела к eTau может представить интерес определение количества eTau в CSF или ISF, которое связано с антителом к eTau. Схематическое изображение способа определения количества eTau в CSF или ISF, связанного с антителом к eTau, дано на Фигуре 54В.

Определение количества свободного внеклеточного Tau

В настоящем изобретении предусматривается способ определения количества внеклеточного Tay (eTau), не связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученным от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau. Способ, как правило, включает: а) осуществление контакта иммобилизованного антитела с образцом CSF или ISF, полученным от субъекта, при этом иммобилизованное антитело конкурирует за связывание с eTau с антителом к eTau, введённым субъекту, и при этом контакт осуществляется в условиях, пригодных для связывания несвязанного eTau с иммобилизованным антителом. и б) определение количества eTau, связанного с иммобилизованным антителом. Количество eTau, связанного с иммобилизованным антителом, указывает на количество eTau, не связанного с антителом к Tay, в образце. В некоторых случаях количество eTau, связанного с иммобилизованным антителом, определяют меченым детектируемой меткой третьим антителом, которое не конкурирует с иммобилизованным антителом за связывание с eTau.

Как отмечается выше, в анализе определяют количество eTau в образце CSF или ISF, полученным от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau. В некоторых случаях антитело к eTau представляет собой терапевтическое гуманизированное антитело к eTau. В некоторых случаях антитело к eTau представляет собой гуманизированное

антитело к eTay по настоящему изобретению. В некоторых случаях антитело к eTay представляет собой hu-IPN002.

В некоторых случаях способ по изобретению включает: а) определение количества eTay, не связанного с антителом к eTay, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTay, описанным выше; и б) определение уровня тотального Tay в образце.

В некоторых случаях способ по изобретению включает: а) определение количества eTay, не связанного с антителом к eTay, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящем лечение антителом к eTay, описанным выше; и б) сравнение уровня несвязанного Tay в образце с уровнем тотального Tay в образце CSF или ISF, полученном от субъекта перед лечением антителом к eTay.

Способ обнаружения по изобретению применим для определения уровня внеклеточного Tay. “Внеклеточный Tay” (“eTay”) в данном контексте охватывает любой Tay-полипептид, который можно обнаружить в спинномозговой (цереброспинальной) жидкости (CSF) или интерстициальной жидкости (ISF). Согласно некоторым вариантам eTay представляет собой полипептид длиной 175 аминокислот и содержит аминокислоты 2-176 полноразмерного Tay; например, согласно некоторым вариантам eTay представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:45. Согласно некоторым вариантам eTay представляет собой полипептид протяжённостью в 171 аминокислоту и содержащий аминокислоты 2-172 полноразмерного Tay; например, согласно некоторым вариантам eTay представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:44. Согласно некоторым вариантам eTay представляет собой eTay-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:46. Согласно некоторым вариантам eTay представляет собой eTay-3 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:47. Согласно некоторым вариантам eTay представляет собой eTay-4 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:48.

Согласно некоторым вариантам eTay-полипептид имеет длину от примерно 50 аминокислот до примерно 175 аминокислот, например, от примерно 50 аминокислот (aa) до примерно 75 aa, от примерно 75 aa до примерно 100 aa, от примерно 100 aa до примерно 125 aa, от примерно 125 aa до примерно 150 aa или от примерно 150 aa до примерно 175 aa; и может содержать от 50 до примерно 75, от примерно 75 до примерно 100, от примерно 100 до примерно 125, от примерно 125 до примерно 150 или от

примерно 150 до примерно 175 последовательных аминокислот из аминокислот 2-176 полноразмерного Tay. Примеры eTay-полипептидов изображены на Фигуре 20.

Определение количества внеклеточного Tay, связанного с антителом к eTay

В настоящем изобретении предусматривается способ определения количества eTay, связанного с терапевтическим антителом к eTay в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение терапевтическим антителом к eTay. Способ обычно включает: а) осуществление контакта иммобилизованного антитела с образцом CSF или ISF, полученным от субъекта, где иммобилизованное антитело не конкурирует за связывание с eTay с антителом к eTay, введённым субъекту, причём указанное осуществление контакта проводят в условиях, пригодных для связывания eTay, связанного с терапевтическим антителом, с иммобилизованным антителом; и б) определение количества комплекса: терапевтическое антитело к eTay/eTay, связанный с иммобилизованным антителом, где количество комплекса терапевтическое антитело к eTay/eTay, связанный с иммобилизованным антителом, является показателем количества eTay, связанного с терапевтическим антителом, присутствующим в образце. Количество комплекса терапевтическое антитело к eTay/eTay, связанный с иммобилизованным антителом, определяют, детектируя антитело к eTay, присутствующее в комплексе антитело к eTay/eTay. Количество комплекса терапевтического антитела к eTay и eTay, связанного с иммобилизованным антителом, определённое детекцией антитела к eTay в комплексе антитело к eTay/eTay, является показателем количества Tay, связанного с терапевтическим антителом в образце CSF или ISF.

Как отмечалось выше, в анализе измеряют количество eTay, связанного с терапевтическим антителом, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTay. В некоторых случаях антитело к eTay представляет собой терапевтическое гуманизированное антитело к eTay. В некоторых случаях антитело к eTay представляет собой гуманизированное антитело к eTay по настоящему изобретению. В некоторых случаях антитело к eTay представляет собой hu-IPN002.

В некоторых случаях способ по изобретению включает: а) определение количества eTay, связанного с антителом к eTay, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTay, описанным выше; и б) определение уровня тотального Tay в образце. В некоторых случаях способ по изобретению включает: а) определение количества eTay, связанного с антителом к eTay, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTay, описанным выше; и б) определение количества eTay, который не связан с терапевтическим антителом к eTay, в

образце CSF или ISF. В некоторых случаях способ по изобретению включает: а) определение количества eTau, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; б) определение уровня тотального Tay в образце; и с) определение количества eTau, который не связан с терапевтическим антителом к eTau, в образце CSF или ISF.

В некоторых случаях способ по изобретению включает: а) определение количества eTau, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и б) сравнение уровня Tay, связанного с антителом к Tay в образце с уровнем тотального Tay в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, перед лечением антителом к eTau.

В некоторых случаях способ по изобретению включает: а) определение количества eTau, не связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; б) определение количества eTau, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и с) сравнение уровня несвязанного Tay и уровня Tay, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, перед лечением антителом к eTau.

Способ обнаружения по изобретению применим для определения уровня внеклеточного Tay, связанного с терапевтическим антителом. “Внеклеточный Tay” (“eTau”) в данном контексте охватывает любой Tay-полипептид, который можно обнаружить в спинномозговой (цереброспинальной) жидкости (CSF) или интерстициальной жидкости (ISF). Согласно некоторым вариантам eTau представляет собой полипептид длиной 175 аминокислот и содержит аминокислоты 2-176 полноразмерного Tay; например, согласно некоторым вариантам eTau представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:45. Согласно некоторым вариантам eTau представляет собой полипептид протяжённостью в 171 аминокислоту и содержащий аминокислоты 2-172 полноразмерного Tay; например, согласно некоторым вариантам eTau представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:44. Согласно некоторым вариантам eTau представляет собой eTau-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:46. Согласно некоторым вариантам eTau представляет собой eTau-3 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:47. Согласно

некоторым вариантам eTau представляет собой eTau-4 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:48.

Согласно некоторым вариантам eTau-полипептид имеет длину от примерно 50 аминокислот до примерно 175 аминокислот, например, от примерно 50 аминокислот (аа) до примерно 75 аа, от примерно 75 аа до примерно 100 аа, от примерно 100 аа до примерно 125 аа, от примерно 125 аа до примерно 150 аа или от примерно 150 аа до примерно 175 аа; и может содержать от 50 до примерно 75, от примерно 75 до примерно 100, от примерно 100 до примерно 125, от примерно 125 до примерно 150 или от примерно 150 до примерно 175 последовательных аминокислот из аминокислот 2-176 полноразмерного Tau. Примеры eTau-полипептидов изображены на Фигуре 20.

Написание (составление) отчёта

В некоторых случаях способ по изобретению включает: а) определение количества eTau, не связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и б) написание отчёта и/или и/или рекомендаций по терапии или мерам для поддержания здоровья субъекта, от которого получен биологический образец. В некоторых случаях способ по изобретению включает: а) определение количества eTau, не связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; б) сравнение уровня несвязанного Tau в образце с уровнем тотального Tau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта перед лечением антителом к eTau; и с) составление отчёта и/или рекомендаций по терапии или мерам для поддержания здоровья субъекта, от которого получен биологический образец.

В некоторых случаях способ по изобретению включает: а) определение количества eTau, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и б) составление (написание) отчёта с результатами определения. Отчёт может также включать как количество несвязанного, так и связанного Tau в образце с уровнем тотального Tau в образце CSF или ISF после лечения антителом к Tau; и количество тотального Tau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта перед лечением антителом к eTau.

Например, отчёт может включать: показание касательно того, наблюдается ли у субъекта положительный клинический отклик на лечение таупатии; показание касательно того, следует ли поддерживать, повышать или снижать дозу антитела к eTau; и т.п.

Так, отчёт может включать информацию, например, такую как рекомендации, относящиеся к последующему обследованию; рекомендация, касающаяся воздействия терапевтического лекарственного средства и/или других способов поддержания здоровья;

рекомендация повысить дозу антитела к eTay; рекомендация сохранить дозу антитела к eTay; рекомендация понизить дозу антитела к eTay; и т.п.

Например, способы по настоящему изобретению могут также включать стадию составления (написания) или выдачи отчёта, в котором представлены результаты обследования субъекта, причём этот отчёт может быть представлен в виде информации на электронных носителях (например, в виде информации на мониторе компьютера) или на материальных носителях (например, отчёт, напечатанный на бумаге или на другом материальном носителе). Человек или организация, которые готовят отчёт (“генератор отчёта”), может также осуществлять такие меры, как сбор образцов, обработку образцов и т.п. Или же другая организация, а не генератор отчёта может осуществлять такие меры, как сбор образцов, обработку образцов и т.п. Отчёт об оценке степени риска может быть предоставлен пользователю. “Пользователь” может быть медицинским работником (например, клиницистом, врачом–лаборантом или терапевтом).

Меры по поддержанию здоровья

В некоторых примерах способ обнаружения по изобретению включает а) определение количества антитела к eTay в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTay, описанным выше; и на основании определённого количества eTay составление отчёта и/или руководства по терапии или мерам для поддержания здоровья субъекта, от которого получен биологический образец.

В некоторых примерах способ по изобретению включает а) определение количества eTay, не связанного с антителом к eTay, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTay, описанным выше; и на основании определённого количества eTay, не связанного с антителом к eTay, сохранение дозы антитела к eTay, которое вводят субъекту. В некоторых примерах способ по изобретению включает а) определение количества eTay, не связанного с антителом к eTay, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTay, описанным выше; и на основании определённого количества eTay, не связанного с антителом к eTay, повышение дозы антитела к eTay, которое вводят субъекту. В некоторых примерах способ по изобретению включает а) определение количества eTay, не связанного с антителом к eTay, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTay, описанным выше; и на основании определённого количества eTay, не связанного с антителом к eTay, уменьшение дозы антитела к eTay, которое вводят субъекту.

Примеры

Нижеприведённые примеры даются с тем, чтобы предоставить рядовому специалисту в данной области техники полное описание того, как осуществлять и применять настоящее изобретение, но не претендуют ни на ограничение объёма того, что заявители рассматривают как своё изобретение, ни на то, что нижеприведённые эксперименты представляют собой все или единственныe проведённые эксперименты. Были предприняты меры для того, чтобы гарантировать точность в том, что касается числовых показателей (например, количеств, температур и т.д.), но возможны некоторые экспериментальные ошибки и отклонения (девиации). Если не указано иное, части означают весовые части, молекулярная масса означает среднюю молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия, а давление представляет собой атмосферное давление или давление, близкое к атмосферному. Могут употребляться стандартные сокращения, например, п.о. (bp), пара(-ы) оснований; kb, т.п.н., тысяча(-и) пар нуклеотидов; пкл, пиколитр(ы); с или сек, секунда(-ы); мин, минута(-ы); ч или час, час(ы); аа, аминокислота(-ы); nt, нт, нуклеотид(ы); в/м, внутримышечный(-о); i.p., и/п, интраперitoneальный(-о); s.c., п/к, подкожный(-о)); и т.п.

ПРИМЕР 1: Клонирование и секвенирование VH и VL областей антител IPN001 и IPN002

Определяли аминокислотные последовательности областей VH и VL антител IPN001 (также называемого в данном контексте “IPN1” или “IPN-1”) и IPN002 (также называемого в данном контексте “IPN2” или “IPN-2”). Аминокислотные последовательности VH и VL областей антитела IPN001 показаны на Фигурах 1А и 1В, соответственно. Аминокислотные последовательности областей VH и VL антитела IPN002 показаны на Фигурах 2А и 2В, соответственно. Домены (участки) CDR показаны жирным шрифтом и подчёркнуты. CDR определяли по номенклатуре Kabat et al. (см Таблицу 1; и J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991)).

ПРИМЕР 2: ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ К ТАУ

Материалы и методы

Локальную фиксацию потенциала (метод пэтч–кламп) на целых клетках кортикальных нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), культивированных на монослое нормальных человеческих астроцитов, проводили с использованием пэтч–пипетки (2-5 мОм, $m\Omega$), заполненной раствором, содержащим (мМ): К-метилсульфат (140), NaCl (10), CaCl₂ (1), Mg-ATP (3); Na-GTP (0.4), EGTA (0.2), HEPES (10), фосфокреатин с корректированным pH= 7.3 и мОСм

(миллиосмоли)=300. Нейроны перфузировали (2 мл/мин) искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей (мМ): NaCl (140), KCl (2.5), MgCl₂ (2), CaCl₂ (2), Hepes (10), D-глюкоза (10), сахароза (20). Корректировали pH= 7.4 мОsm = 310. Показания снимали с применением программы для сбора данных pClamp-10.3 (Molecular Devices) и усилителя MultiClamp 700B (Axon Instrument; Foster City CA). AD Tay и AD Tay, предварительно инкубированный с IPN001 или IPN002 (2 час при комнатной температуре или 24 час при 4° С в весовом соотношении 10:1), наносили с помощью микроперфузионной системы MinisQuirt (AutoMate, Berkeley, CA). Анализ данных проводили в режиме оффлайн с применением аналитической программы Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Все показания снимали при комнатной температуре.

Результаты

Данные показаны на Фигурах 3A-D.

Нанесение (раствора) AD-Tay (6 мк/мл) вызывала деполяризацию мембранны кортикальных нейронов (**A, B** и **C**). Преинкубация AD-Tay (6 мкг/мл) с IPN001 (60 мкг/мл) (**A**) или IPN002 (60 мкг/мл) (**B**) в течение >2 час снижала деполяризацию мембранны, опосредуемую AD-Tay. **C.** Преинкубация AD-Tay (6 мкг/мл) с мышьим IgG (60 мкг/мл) не снижала опосредуемую AD-Tay деполяризацию мембранны в кортикальных нейронах. **D.** Данные, показывающие, что IPN001 и IPN002 значительно снижали опосредуемую AD-Tay деполяризацию мембранны (Парный t-критерий * p<0.037; ** p < 0.009, p < 0.003).

ПРИМЕР 3: ИММУНОРЕАКТИВНОСТЬ IPN001 И IPN002 К ТАУ В CSF БОЛЬНЫХ AD

Цереброспинальную жидкость (CSF) отбирали у 10 здоровых доноров (1 мл у каждого). Также отбирали CSF у 10 пациентов с болезнью Альцгеймера (AD) (1 мл у каждого). Аликвоты пулов CSF сохраняли для анализа ELISA. 10 мл среды, кондиционированной кортикоидными нейронами, дифференцировали в течение 315 дней из “дауновских” индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC). Линию iPSC (8941.1) использовали в качестве контроля для полученных аффинной хроматографией изолятов CSF и аликвоту также оставляли для анализа ELISA. Для определения, действительно ли CSF содержит IPN002-реактивный Tau, каждый из собранных образцов CSF и кондиционированные среды предварительно очищали на смоле с иммобилизованным IgG1 и затем элюат наносили на смолу с иммобилизованным IPN001. Смолы с IPN001 тщательно отмывали фосфатно–солевым буферным раствором (PBS) и связанные белки элюировали раствором 50 мМ глицина, 150 мМ NaCl, pH 2.3 и после элюирования нейтрализовали 1M Tris, pH 8.3. Элюированные белки концентрировали на концентраторах YM10 и добавляли в буфер для образцов для

электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата (SDS-PAGE) и для Вестерн–блоттинга.

Для того чтобы определить, реагирует ли IPN002 с любой формой Tay в CSF, Вестерн–блот белка, элюированного с IPN002, исследовали с использованием IPN001, Santa Cruz Tay H- 150 (aa1-150) и с Dako Tay #A0024 антителом, которое реагирует с С-концом (aa#243-441) Tay. Результаты показаны на Фигуре 4А-С.

Вестерн–блоттинг показал, что в IPN002 аффинно очищенном белке CSF как здоровых, так и больных AD имеются имmunoreактивные полосы IPN001 (Фигура 4а) и Tay H-150 (Фигура 4б), которые находятся в интервале молекулярной массы от ~25 кДа до 37 кДа. Эти фрагменты Tay аналогичны по размеру, но не по своей относительной интенсивности, с фрагментами eTay, выделенными из среды, кондиционированной “дауновской” линией клеток. Антитело к Dako С-концевой Tay (Фигура 4с) не обнаружило каких-либо реактивных компонентов IPN002–аффинного изолята (изолята, аффинно очищенного на смоле с IPN002) как из CSF, так и кондиционированной среды. Полноразмерный Tay не обнаруживался ни одним из антител к Tay из IPN002–аффинного изолята. Так как IPN002–аффинно выделенные белки были реактивны по отношению к IPN001 и к IPN002 в Вестерн–блоттинге, был сделан вывод, что Tay в CSF также реактивен к IPN001.

Элюат CSF и кондиционированной среды с IPN002–аффинных смол затем последовательно наносили на и элюировали с T46 (Tay #428-441) и HT7 (Tay #159-163), чтобы определить, присутствуют ли какие-нибудь С-концевые или срединные (внутренние) фрагменты Tay, которые не были выделены с помощью IPN002. Элюаты гибридизовали с Dako С-концевым антителом (Фигура 4с), но никакой иммунореактивности не было обнаружено. Эти результаты подтверждают, что Tay, иммунореактивный по отношению к IPN001 и IPN002, имеется в большем количестве, чем полноразмерный, только срединные или С-концевые фрагменты Tay.

Аликовты элюатов каждой из CSFs и кондиционированных сред сохраняли для сравнения до (пре) и после (пост) выделения, чтобы определить, действительно ли весь детектируемый Tay был удалён в процессе выделения, с использованием коммерчески доступного набора, обычно применяемого для определения уровней Tay в CSF. Результаты представлены на Фигуре 5. Этот анализ показал, что весь детектируемый Tay был удален из пост-CSF образцов в процессе аффинного выделения.

Эти результаты дают строгое доказательство того, что как IPN001, так и IPN002 реагируют с компонентами Tay, присутствующими в CSF как здоровых, так и больных AD пациентов.

ПРИМЕР 4: Обнаружение eTau в образцах, полученных от пациентов

Материалы и методы

Сбор сред, кондиционированных полученными из iPSC кортикальными нейронами

iPSC (индивидуированные плюрипотентные стволовые клетки) получали от здоровых контрольных пациентов и пациентов с болезнью Альцгеймера соответствующих возрастных групп, используя метод Yamanaka (*Takahashi et al. (2007) Cell* **131**(5), 861), как описано в публикации Dimos et al. (2008) *Science* **321**:1218. iPSC дифференцировали в кортикальные нейроны в основном в соответствии с опубликованными протоколами, применяя метод с двойным монослоем белков SMAD (Chambers et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* **27**:275), с последующей дифференцировкой в кортикальные нейроны, аналогично методу, описанному в публикации Shi et al. (2012) *Nat. Neurosci.* **15**:477). Полученные из iPSC кортикальные нейроны (iPSC-CN), культивированные в течение 108 дней, отмывали, добавляли свежую среду, и, если не указано иное, через три дня собирали кондиционированную среду. Осуществляли несколько дифференцировок и использованием этих линий, чтобы гарантировать воспроизводимость уровней eTau. Кондиционированную среду центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 мин, а затем проводили Вестерн-блоттинг или Tay ELISA. Для эксперимента с брефелдином A культуры iPSC-CN отмывали PBS, а затем добавляли свежую среду, содержащую или не содержащую 1 мкМ брефелдина, и среду кондиционировали в течение одного часа, а потом собирали.

Сбор среды, кондиционированной человеческими первичными кортикальными нейронами

Культуры человеческих кортикальных нейронов (НСС) готовили как описано в публикации Wright et al. (2007) *Neurobiol. Aging* **28**:226. Коротко говоря, человеческая эмбриональная ткань коры головного мозга была получена в Advanced Bioscience Resources (Alameda, CA) и удовлетворяла федеральным установкам по исследованиям на эмбрионах и Акту об анатомическом дарении. Ткань отмывали в буферном солевом растворе Хэнка (Cellgro) и растирали в присутствии 1 мкг/мл ДНК-азы (EMD) и пропускали через клеточный фильтр с диаметром отверстий 100 мкм. После центрифугирования клеточный осадок ресуспендировали в 0.05% трипсин/EDTA (Invitrogen) в течение 20 мин при 37°C. Трипсин инактивировали, добавляя равный объём среды, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), и образец осторожно растирали опять же в присутствии ДНК-азы. После центрифугирования клетки ресуспендировали в среде для чашек Петри (нейробазальная среда Neurobasal,

содержащая B27, Invitrogen) и считали. Клетки засевали на плашки (планшеты) или на покровные стёкла, покрытые поли- δ -лизином с ламинином. Трёхнедельные НСС отмывали, добавляли свежую среду и после трёх дней кондиционирования среду собирали. Кондиционированную среду центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 минут, а затем анализировали методом Вестерн-блоттинга.

Сбор образцов P301L мышиного ISF и человеческого CSF

Мышам проводили анестезию с помощью изофлурана (2%, 800 мл/мин O₂). Для местного обезболивания применяли бупивакайн/эпинефрин, а для пери-/послеоперационного обезболивания применяли финадин. Животных помещали в стереотаксическую раму (Kopf instruments, USA). Зонды для микродиализа с системой двухтактной накачки (мембрана содержит фосфатидилэтаноламин (PEE, ФЭА), Brainlink, the Netherlands) вводили в гиппокамп (открытая (обнажённая) поверхность 3 мм). Отбор образцов для микродиализа проводили через 24 и через 48 часов после операции. В день отбора образцов зонды животных с помощью трубы из (полимера) фторированного этилен–пропилена (FEP) соединяли с микроперфузионным насосом (шприцевой насос Harvard PHD 2000 Syringe pump, Holliston, MA или аналогичный). Зонды для микродиализа перфузировали искусственной CSF (aCSF), содержащей 147 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂ и 1.2 mM MgCl₂, и 0.15% альбумина бычьей сыворотки (BSA), при скорости потока 0.75 мкл/мин. Образцы для микродиализа собирали в течение 60 минут. После периода стабилизации собирали базальные образцы. На второй день отбора образцов повторяли вышеописанную процедуру (Brains Online). Интерстициальную жидкость (ISF) центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 минут и прозрачные супернатанты использовали для eTay Вестерн-блоттинга.

Отбирали 10 мл CSF (Precision Med) у 10 здоровых (Precision Med), 10 AD пациентов (Precision Med) и 10 PSP пациентов, центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 минут, супернатанты, предварительно очищенные на IgG–аффинной смоле с последующим выделением Tay на IPN002 (антитело к Tay)–аффинной смоле, отмывали, элюировали раствором 50 mM глицина, pH 2.3, со 150 mM NaCl в пробирку, содержащую 1M TBS, pH 8.3 для нейтрализации pH, концентрировали на фильтрах YM10 и готовили для белкового (Tay) блоттинга (Вестерн-блоттинга). ciPSC-CN–кондиционированную среду от пациента fAD PSEN1 аналогичным образом выделяли в качестве положительного контроля для сравнения характера полос.

Вестерн–блоттинг

Кондиционированную среду разводили буфером Лэммли (Sigma). Культивированные нейроны отмывали в PBS, а потом инкубировали в 0.05% трипсине в

DMEM (Invitrogen), отмывали и лизировали в буфере Лэммли. Все образцы кипятили, делили на трис-глицин–полиакриламидном геле (Invitrogen) и переносили на нитроцеллюлозу с помощью системы iBlot (Invitrogen). Мембранны инкубировали в блокирующем буфере (LiCor), выдерживали с 0.5 мкг/мл IPN001 антитела к Tay и с антителом к β-актину (1:2000; Abcam) в блокирующем буфере, содержащем 0.1% Tween-20, вторичными антителами к мышенному антителу 680 и кроличьему антителу 800 (LiCor). Блоты сканировали с помощью системы визуализации в ИК–области Odyssey SA и анализировали, используя программу Odyssey SA (LiCor).

ELISA Tay-полипептида

Среду собирали после периода кондиционирования в течение трёх дней из культур полученных из iPSC кортикальных нейронов и анализировали с помощью гомогенного анализа на основе технологии AlphaScreen™ для определения количества Tay. 10 мкг/мл акцепторных гранул AlphaLISA с антителом к Tay и 1 нМ биотинилированного антитела к Tay перемешивали с кондиционированной средой в течение ночи при комнатной температуре. При комнатной температуре в течение 30 минут прибавляли 40 мкг/мл донорных гранул со стрептавидином (Perkin Elmer) и считывали планшет на планшетном ридере Envision.

Очистка eTay

Кондиционированную среду, собранную с iPSC-CN от AD пациентов, центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 минут, супернатанты собирали и предварительно очищали на IgG–аффинной смоле. Предварительно очищенный супернатант пропускали через смолу с IPN002 антителом к тау, отмывали и eTay элюировали раствором, содержащим 50 мМ цитрата натрия, pH 2.3 со 150 мМ NaCl, в пробирку, содержащую 1 М TBS, pH 8.3, для нейтрализации pH. Элюат концентрировали и буфер меняли на PBS.

Иммунофлуоресценция

MCC отмывали в PBS, фиксировали в 4% параформальдегиде, блокировали 10% нормальной ослиной сывороткой (Jackson ImmunoResearch) в PBS, permeabilizировали (если специально не указано иное) с помощью 0.2% Тритон-Х-100 в PBS в течение 15 минут и окрашивали, применяя IPN001 антитело к Tay, вторичным антителом осла к мышенному иммуноглобулину–A488 (Molecular Probes) и DAPI (Invitrogen). Изображения получали с помощью микроскопа Leica DMI 600 В с увеличением 40x с применением программ LAS AF (Leica). Конфокальные изображения получали с помощью конфокального микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon).

Результаты

Анализы проводили с целью обнаружить фрагменты eTau в различных жидкостях. Результаты показаны на Фигуре 7. Как показано на Фигуре 7, левый рисунок, эндогенный Tau секретируется кортикальными нейронами, полученными из человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (человеческих iPSC-кортикальных нейронов; iPSC-CN), и секреируемый Tau называется внеклеточным Tau или “eTau.” Как показано на Фигуре 7, второй рисунок слева, eTau присутствует также в кондиционированной среде после культивирования человеческих первичных нейронов (человеческих кортикальных клеток; “HCC”), это подтверждает, что eTau не является артефактом процесса iPSC-дифференцировки. Эти фрагменты eTau были также обнаружены в лизатах нейронов, это даёт основание полагать, что Tau расщепляется внутри нейронов перед секрецией eTau.

Как показано на Фигуре 7, средний рисунок, аналогичные фрагменты Tau были обнаружены в интерстициальной жидкости (ISF) P301L Tau мышей, где полноразмерный Tau не был обнаружен ни в одной из систем. P301L мыши являются трансгенными по мутантной форме человеческого Tau, содержащего мутацию P301L; мыши P301L являются моделями таупатии у человека. См., например, Götz et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:529; и Lewis et al. (2000) *Nature Genetics* 25:402.

Как показано на Фигуре 7, рисунки справа, уровни eTau повышаются в CSF от AD пациентов, и многие линии пациентов с наследственной AD (fAD) сравнивали с линиями здоровых пациентов. Как показано на Фигуре 7, рисунки справа, eTau был обнаружен также в CSF пациентов с PSP.

ПРИМЕР 5: ЕТАУ ИНДУЦИРУЕТ ГИПЕРАКТИВНОСТЬ НЕЙРОНА

Методы

Локальную фиксацию потенциала (метод пэтч-кламп) на целых клетках кортикальных нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), культивированных на монослое нормальных человеческих астроцитов, проводили с использованием микропипетки (2-5 мОм, мΩ), заполненной раствором, содержащим (мМ): К-метилсульфат (140), NaCl (10), CaCl₂ (1), Mg-ATP (3); Na-GTP (0.4), EGTA (0.2), HEPES (10), фосфокреатин с корректированным pH= 7.3 и мОсм =305. Нейроны перфузировали (2 мл/мин) искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей (мМ): NaCl (140), KCl (2.5), MgCl₂ (2), CaCl₂ (2), Hepes (10), D-глюкоза (10), сахароза (20). Корректировали pH= 7.4 мОсм = 310. Показания снимали с применением программы для сбора данных pClamp-10.3 (Molecular Devices) и усилителя MultiClamp 700B (Axon Instrument; Foster City CA). Нанесение eTau или eTau с ингибиторами,

тетродоксином (Tocris), MK801 (Sigma), NBQX (Tocris) или с антителом к Tau IPN001, осуществляли с помощью микроперфузационной системы MinisQuirt (AutoMate, Berkeley, CA). Анализ данных проводили в режиме оффлайн с применением аналитической программы Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Все показания снимали при температуре 34-37°C.

Результаты

Для того, чтобы определить, может ли eTau изменять функцию нейрона, очищенный фрагмент eTau eTau наносили на iPSC-CN или НСС. Результаты показаны на Фигурах 8А-С.

Как показано на Фигуре 8А, добавление очищенного фрагмента eTau к этим нейронам стимулировало гиперактивность. Как показано на Фигуре 8В, гиперактивность, индуцированная смесью eTau, ингибировалась тетродоксином (TTX) и NMDA и AMPA антагонистами рецепторов глутамата, MK801 и NBQX, соответственно. TTX блокирует потенциалы действия в нервах за счёт связывания с потенциал-зависимыми натриевыми каналами в мембранах нервных клеток. Эти данные подтверждают, что eTau-индуцированная гиперактивность нейронов зависит от действия потенциал-зависимого высвобождения глутамата. Напротив, как показано на среднем рисунке Фигуры 8А, нанесение полноразмерного Tau не вызывало заметных (детектируемых) изменений активности нейронов даже при значительно более высоких концентрациях, это показывает, что индуцируемая eTau гиперактивность зависит от фрагментов Tau. Эти результаты по индуцируемой eTau гиперактивности дают веские основания предполагать, что в нейронах могла происходить мобилизация кальция. Для того, чтобы определить, происходит ли мобилизация кальция в нейронах, проверяли воздействие eTau на мобилизацию кальция. Как показано на Фигуре 8С, eTau-1а вызывает стойкую мобилизацию кальция. Этот тип гиперактивности нейронов, если он поддерживается при хроническом состоянии, например, таком как при AD, может привести к дисфункции нейронов посредством изменённого возбуждения в синапсах и аберрантной стимуляции нейронов. eTau-1а включает аминокислоты 2-166 фетального Tau, т.е. аминокислоты 2-166 последовательности SEQ ID NO:27.

ПРИМЕР 6: АНТИТЕЛО К ТАУ СНИЖАЕТ ГИПЕРАКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ, ОПОСРЕДУЕМУЮ ЕТАУ

Электрофизиологические анализы проводили как описано в Примере 5. Оценивали воздействие IPN001 и IPN002 на опосредуемую eTau гиперактивность нейронов.

Как показано на Фигуре 8D, IPN001 снижает опосредуемую eTau гиперактивность нейронов. Как показано на Фигуре 19B, IPN002 снижает опосредуемую eTau гиперактивность нейронов.

ПРИМЕР 7: ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К ТАУ

Были получены гуманизированные варианты IPN002. Аминокислотные последовательности VH доменов (участков) тяжёлой цепи гуманизированных вариантов 1-4 и нуклеотидные последовательности, кодирующие VH домен тяжёлой цепи гуманизированных вариантов, показаны на Фигурах 9-12. Аминокислотные последовательности VH доменов лёгкой цепи гуманизированных вариантов 1-4 и нуклеотидные последовательности, кодирующие VH домен лёгкой цепи гуманизированных вариантов, показаны на Фигурах 13-16. Отличия аминокислотных последовательностей от аминокислотной последовательности IPN002 представлены в Таблицах 4 и 5.

Таблица 4: VH варианты

Положение аминокислоты	IPN002 (Исходное антитело)	VH Вариант 1	VH Вариант 2	VH Вариант 3	VH Вариант 4
3	H	H	H	Q	Q
19	K	R	R	R	R
40	T	A	A	A	A
42	D	G	G	G	G
44	R	G	G	G	G
66	Q	R	R	R	R
83	S	S	N	N	N
86	K	K	R	R	R
87	S	S	A	A	A
93	S	S	S	S	A
108	S	S	T	T	T

Таблица 5: Vk варианты

Положение аминокислоты	IPN002 (Исходное антитело)	Vk Вариант 1	Vk Вариант 2	Vk Вариант 3	Vk Вариант 4
3	L	L	V	V	V
7	T	S	S	S	S
14	S	T	T	T	T
17	D	Q	Q	Q	Q
18	Q	P	P	P	P
45	K	Q	Q	Q	Q
48	V	V	V	V	I
83	L	V	V	V	V
85	T	T	T	V	V
104	L	V	V	V	V

Ниже даются однобуквенные обозначения аминокислот:

- G - Глицин (Gly)
- P - Пролин (Pro)
- A - Аланин (Ala)
- V - Валин (Val)
- L - Лейцин (Leu)
- I - Изолейцин (Ile)
- M - Метионин (Met)
- C - Цистеин (Cys)
- F - Фенилаланин (Phe)
- Y - Тирозин (Tyr)
- W - Триптофан (Trp)
- H - Гистидин (His)
- K - Лизин (Lys)
- R - Аргинин (Arg)
- Q - Глутамин (Gln)
- N - Аспарагин (Asn)
- E – Глутаминовая кислота (Glu)
- D – Аспарагиновая кислота (Asp)
- S - Серин (Ser)
- T - Треонин (Thr)

ПРИМЕР 8: ХАРАКТЕРИСТИКА ГУМАНИЗИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ IPN002

Величины относительной аффинности связывания с Tay для связывания с каждым из рекомбинантных Tay (рекомбинантный Tay из 383 аминокислот), а также с eTay 1a, eTay1b, eTay2, eTay3 и eTay4 для каждой из 16 комбинаций VH#1-4 с Vk#1-4 антитела показаны в Таблице 4, представленной на Фигуре 17. Относительная аффинность связывания для каждого вида Tay и eTay находится в интервале от 121 пМ до 1030 пМ для каждой из VH/Vk комбинаций антитела. eTay 1a включает аминокислоты 2-166 фетального Tay, т.е. аминокислоты 2-166 последовательности SEQ ID NO:27; а eTay 1b включает аминокислоты 2-196 и 217-228 фетального Tay, т.е. аминокислоты 2-196 и 217-228 последовательности SEQ ID NO:27. Аминокислотные последовательности eTay3 и eTay 4 приводятся на Фигуре 20.

Для того чтобы получить абсолютную аффинность, а также значения K_{on} и K_{dis} для этих VH/Vk человеческих антител, проводили анализ на платформе Octet с

использованием Tay (рекомбинантный Tay, содержащий 383 аминокислоты). Значения K_D составляли интервал от 42.6 пМ до 2120 пМ. Для всех VH/Vk вариантов значения K_{on} были высокими, а значения K_{dis} были низкими по отношению к Tay для каждого образца Tay. Данные приводятся в Таблице 5, которая представлена на Фигуре 18.

Для группы вышеописанных гуманизированных вариантов IPN002 были проведены дополнительные анализы. Как показано на Фигуре 19А, три варианта, VH2/Vk1, VH2/Vk2 и VH2/Vk3, использовались для Вестерн-блоттинга с различными модификациями для образцов, содержащих Tay. Образцы, содержащие Tay, включали iPSC-CN-кондиционированную среду; iPSC-CN лизаты; лизаты мозга больных AD; и лизаты коры головного мозга мышей P301L Tay; и лизаты мозга яванского макака. Результаты показывают, что вышеописанные варианты гуманизированного IPN002 являются реактивными по отношению к Tay в различных образцах.

У группы вышеописанных вариантов гуманизированного IPN002 проверяли способность снижать индуцированную eTau гиперактивность нейронов. Как показано на Фигуре 19В, исходное антитело IPN002 и варианты VH2/Vk1, VH2/Vk2 и VH2/Vk3 блокировали гиперактивность, индуцированную eTau.

ПРИМЕР 9: ТЕСТИРОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ГУМАНИЗИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ IPN002

Было проведено определение иммуногенного потенциала гуманизированного антитела к Tay. Был использован анализ EpiScreen™. См., например, Jones et al. (2004) *J. Interferon Cytokine Res.* 24:560; и Jones et al. (2005) *J. Thromb. Haemost.* 3:991. Кинетические анализы на Т-клетках осуществляли, используя истощённые по CD8⁺ мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC); а пролиферацию Т клеток определяли, вводя [³H]-тимидин в различные временные точки после добавления образцов тестируемого антитела.

PBMC выделяли из лейкоцитарной плёнки группы здоровых доноров (например, из крови, отбираемой в течение 24 часов тестирования). Реакции Т- клеток на тестируемое антитело (например, гуманизированный вариант IPN002) сравнивали с их реакциями на стандартное антитело.

Для получения образца для испытаний очищенное тестируемое антитело (гуманизированный вариант IPN002) добавляли в культуры PBMC *in vitro* до конечной концентрации 50 мкг/мл в культуральной среде. В качестве контрольных образцов были включены клинический контроль антитела (положительный контроль) и контроль одной только культуральной среды (нестимулированный контроль). Образцы для испытаний (PBMC плюс тестируемое антитело) и контрольные образцы инкубировали в течение 8

дней при 37°C с 5% CO₂. На 5, 6, 7 и 8 день клетки в образцах для испытаний и в контрольных образцах суспенсировали и переносили в лунки многолуночного культурального планшета. Образцы для испытаний и контрольные образцы выдерживали в импульсном режиме с 0.75 мКи (микрокюри) [³H]-тимицина и инкубировали ещё в течение 18 часов, а затем собирали на плоских фильтрах. Число импульсов в минуту (срм) для каждой лунки определяли, считая сцинтилляции.

Для анализа пролиферации использовали порог SI, равный или превышающий 2; образцы, индуцирующие пролиферативный ответ выше этого порога, считали позитивными. SI (индекс стимуляции) означает среднее число импульсов для тестируемого образца, делённое на среднее значение для нестимулированного контрольного образца.

Результаты показаны на Фигурах 21А-С. Т-клеточная пролиферация у здоровых доноров отвечает на тестируемое гуманизированное IPN002 антитело. Собирали образцы РВМС из смешанных культур и определяли пролиферацию на 5, 6, 7 и 8 день после инкубации с испытуемыми образцами. Отклики пролиферации с $SI \geq 2.0$ ($p < 0.05$), показанным пунктирной горизонтальной линией, которые были значительными ($p < 0.05$) при определении с использованием непарного t-критерия Стьюдента в двух выборках, считали положительными.

Как показано на Фигуре 21А, тестируемое полностью гуманизированное антитело IPN002 имело низкий иммуногенный потенциал (ниже порога SI 2.0). На Фигуре 21В показаны результаты, полученные с использованием эталонного химерного антитела, где эталонное химерное антитело имеет вариабельные области тяжёлой и лёгкой цепи мышиного IPN002 и константную область человеческого IgG4; и на Фигуре 21С показаны результаты, полученные с иммуногенным клиническим контрольным гуманизированным А33 антителом.

ПРИМЕР 10: IPN002 СНИЖАЕТ УРОВЕНЬ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО TAU IN VIVO

Определяли влияние введения IPN002 на уровень Tau, фосфорилиированного по аминокислотам 202 и 205.

Использовали P301L мышнюю модель. Мыши P301L являются трансгенными по форме человеческого Tau, содержащего мутацию P301L; Мыши P301L являются моделями таупатии у человека. См., например, Götz et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:529.

Мышам P301L (в возрасте 3-4 месяца) вводили: 1) контрольный IgG; 2) PHF1 антитело к фосфорилиированному Tau; или 3) IPN002. IgG контроль и IPN002 антитела инъектировали интраперитонеально в концентрации 10 мг/кг в течение 4 недель; затем 20 мг/кг в течение последующих 4 недель. PHF1 вводили в концентрации 10 мг/кг в течение

всего 8-недельного курса. На 60 день после начала введения антитела определяли уровень фосфорилированного Tay в гиппокампе. Результаты показаны на Фигуре 22.

Tay, фосфорилированный по аминокислотам 202 и 205, обозначен как “AT8.” Как показано на Фигуре 22, обработка посредством IPN002 привела в результате к статистически значимому снижению нерастворимого фосфо-Tay (AT8) по определению методом ELISA (левый рисунок), и тенденции к снижению по определению с помощью Вестерн-блоттинга (правый рисунок) по сравнению с IgG контролем. В случае обработки PHF1 наблюдалась тенденция к снижению нерастворимого AT8, что подтверждает результаты, полученные Chai et al. ((2011) *J. Biol. Chem.* 286:34457) и Boutajangout et al. ((2011) *J. Neurochem.* 118:658).

ПРИМЕР 11: IPN002 СНИЖАЕТ УРОВЕНЬ СВОБОДНОГО ТАУ КАК В ISF, ТАК И В CSF

Проводилось определение влияния введения IPN002 на уровни свободного Tay в CSF и интерстициальной жидкости (ISF). Мышей P301L обрабатывали как описано в Примере 10. Уровни свободного Tay в ISF, не связанного с IPN002, определяли с использованием IPN001. Как показано на Фигуре 23, введение IPN002 снижало уровни свободного Tay (не связанного с IPN002) (левая панель) в ISF у P301L мышей, получавших IPN002.

Для того, чтобы определить, действительно ли IPN002 снижает уровень свободного Tay в CSF в той же степени, что и в ISF, мышей P301L обрабатывали так, как описано в Примере 10, и определяли влияние введения IPN002 на уровень свободного Tay (не связанного с IPN002) в CSF получавших лечение мышей. Результаты приводятся на Фигуре 24.

На левом рисунке Фигуры 24 показаны уровни свободного Tay (не связанного с IPN002; обозначенного как “Свободный Tay (без IPN002)”) в CSF непролеченных, получавших контрольный IgG, получавших PHF1 и получавших IPN002 мышей. Как показано на правом рисунке Фигуры 24, уровни свободного Tay в CSF сопоставимы с уровнями свободного Tay в ISF мышей, получавших IPN002, это показывает, что наблюдается хорошая корреляция результатов анализа Tay в ISF с результатами анализа более клинически релевантного материала, CSF.

ПРИМЕР 12: АНТИТЕЛО К ТАУ СНИЖАЕТ ГИПЕРАКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ, ОПОСРЕДОВАННУЮ еТАУ

Электрофизиологические анализы проводили как описано в Примере 5. Определяли влияние IPN002 на гиперактивность нейронов, индуцируемую e-Tay.

Как показано на Фигуре 25, IPN002 снижает опосредуемую eTay гиперактивность нейронов.

ПРИМЕР 13: ТАУ–ФРАГМЕНТЫ ПРИСУТСТВУЮТ В CSF, ПОЛУЧЕННОЙ ОТ СУБЪЕКТОВ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА ХРОНИЧЕСКУЮ ТРАВМАТИЧЕСКУЮ ЭНЦЕФАЛОПАТИЮ (СТЕ, ХТЭ)

Образцы CSF были получены от бывших нападающих форвардов Национальной Футбольной Лиги, у которых наблюдалось поведенческое/когнитивное расстройство и, рассматривалось наличие у них, с большой долей вероятности, СТЕ. Образцы CSF анализировали на присутствие фрагментов eTau. Фрагменты eTau выделяли аффинно из собранных CSF здоровых субъектов и субъектов с подозрением на СТЕ. Выделенные фрагменты eTau разделяли электрофорезом в акриламидном геле; разделённые фрагменты переносили на мембрану. Мембрану выдерживали с IPN001. Результаты, представленные на Фигуре 26, показывают, что фрагменты Tau присутствуют в CSF, полученной от субъектов с подозрением на СТЕ.

ПРИМЕР 14: СВЯЗЫВАНИЕ ГУМАНИЗИРОВАННОГО ВАРИАНТА IPN002 С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ТАУ–ПЕПТИДАМИ

Связывание гуманизированного варианта IPN002 (“hu-IPN002”) с синтетическим биотинилированным Tau–пептидом 1 и 2 анализировали как твердофазным, так и жидкофазным методом.

Ниже представлены аминокислотные последовательности Пептида 1 и Пептида 2:

Пептид 1 (Tau аминокислоты 13-24): DHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO:49);

Пептид 2 (Tau аминокислоты 15-44):

AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTAGLK (SEQ ID NO:50).

Антитело или биотинилированный пептид разводили фосфатно–солевым буферным раствором. Ниже даются конечные концентрации: 1 мкг/мл hu-IPN002; 1 мкг/мл rTau383 (pTau383, полноразмерный рекомбинантный Tau); 5 мкг/мл (биотинилированный Пептид 1); и 5 мкг/мл (биотинилированный Пептид 2). 100 мкл 0.1% казеина в PBS добавляли в лунки многолуночного планшета. Добавляли 150 мкл 1 мкг/мл раствора hu-IPN002. Делали серийные разведения. В лунки, содержащие серийные разведения антитела, добавляли 100 мкл коньюгата биотин–пептид. Многолуночный планшет инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; а затем 2 раза в PBS.

В лунки добавляли вторичное антитело, коньюгированное со стрептавидин–пероксидазой хрена (HRP), и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; а затем 2 раза в PBS.

Добавляли субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ) и инкубировали в течение 1-15 минут. Реакцию останавливали, добавляя 100 мкл 1 N серной кислоты. Оптическую плотность считывали при 450 нм.

Результаты показаны на Фигурах 27 и 28 и суммированы в Таблице 6.

Таблица 6

	Hu-IPN002 кДа [M] w/ биотин-гTau383	Hu-IPN002 кДа [M] w/ биотин-Пептид 1	Hu-IPN002 кДа [M] w/ биотин-Пептид 2
твердофазный	1.071E-10	1.062E-10	2.777E-10
в растворе	1.135E-10	1.364E-10	3.698E-10

На Фигуре 29 показано связывание hu-IPN002 с полноразмерным рекомбинантным Tay (гTau-383) и фосфатаза-активирующим доменным (PAD) пептидом (Tay аминокислоты 2-28; AEPRQEFEVVMEDHAGTY; SEQ ID NO:80). Как показано на Фигуре 29, hu-IPN002 не связывает PAD пептид.

На Фигуре 30 показано, что небиотинилированный Tay Пептид 1 (Tay аминокислоты 13- 24) и небиотинилированный Пептид 2 (Tay аминокислоты 15-44) конкурируют за связывание с hu-IPN002. Эти результаты показывают, что связывание Tay Пептида 1 и Tay Пептида 2 с hu-IPN002 является специфическим, а не результатом добавления биотина.

ПРИМЕР 15: IN VIVO ВЛИЯНИЕ IPN002 НА ПАТОЛОГИЮ

В данном исследовании изучалось действие терапевтического вмешательства на пониженную подвижность и Tay патологию у трансгенной мышой модели таупатии (hTau.P301L-Tg). У этих мышей, клинический мутант человеческого Tay (P301L) экспрессируется под контролем промотора мышиного *Thy1* (нейроспецифическая экспрессия). Поведение (тест на равновесие “прогулка по приподнятой перекладине”) проверяли в возрасте 7, 8, 8.5 и 9 месяцев, а также за день до окончания исследования. Конечные критерии оценки в исследовании включали: (1) выживаемость; (2) поведение: результаты теста “прогулка по приподнятой перекладине” и оценка хватательного рефлекса; (3) биохимия: весь (общий) Tay в тотальном гомогенате, фракциях растворимых и нерастворимых белков ствола головного мозга; и (4) биомаркеры: AT8 в тотальном гомогенате и во фракциях растворимых и нерастворимых белков ствола головного мозга.

Материалы и методы

Мышам P301L (в возрасте 3-4 месяца) вводили: 1) контрольный IgG; 2) PHF1 антитело к фосфорилированному Tay; или 3) IPN002. Антитела IgG контроль и IPN002 вводили в виде интраперitoneальных (внутрибрюшинных) инъекций в дозе (концентрации) 20 мг/кг раз в неделю в течение 6 месяцев. PHF1 вводили в дозе 10 мг/кг

в течение 6 месяцев. PHF1 представляет собой мышное моноклональное антитело, которое распознаёт эпитоп, включающий фосфо-Ser³⁹⁶ и фосфо-Ser⁴⁰⁴. Santacruz et al. (2005) *Science* 309:476.

Масса тела и хватательный рефлекс

Массу тела определяли еженедельно в течение исследования и после выведения из эксперимента (умерщвлённые). Массу тела и оценку хватательного рефлекса регистрировали еженедельно с начала исследования до 7-месячного возраста. Начиная с 7 месяцев и далее проводили мониторинг дважды в неделю, проверяя двигательную активность в домашней клетке, потерю в весе и первые признаки хватательного рефлекса задних и передних лап. Как только появлялись симптомы хватательного рефлекса, массу тела измеряли ежедневно, а хватательный рефлекс оценивали до момента ‘преждевременного выведения из эксперимента’ (умерщвлении). Для оценки хватательного рефлекса мышей держали примерно на 1.5 см выше основания хвоста около десяти секунд. Хватательный рефлекс оценивали по 4^x-балльной шкале отдельно для каждой лапы. Преждевременно выведенные из эксперимента (умерщвлённые) мыши получали максимальную оценку. В качестве подтверждающего доказательства для решения об умерщвлении использовали прежде всего оценку хватательного рефлекса передних лап. Это решение основывалось на совместном изучении хватательного рефлекса, потери в весе и подвижности в домашней клетке и на стандартных критериях. Оценки левой и правой задних лап, объединённые в одну оценку хватательного рефлекса, использовали для оценки эволюции хватательного рефлекса в ходе эксперимента и оценку групповых различий в конце эксперимента. Мышей, которые умерли преждевременно вследствие эпилепсии, исключали из исследования. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для повторных измерений с поправкой Бонферрони для post-hoc сравнений и t-критерий Стьюдента для средних по группе последних оценок хватательного рефлекса перед умерщвлением, соответственно.

Прогулка по приподнятой перекладине

Тест на равновесие, прогулку по приподнятой перекладине, проводили на мышах в базовой группе (группе перед исследованием) и в возрасте 7, 8, 8.5 и 9 месяцев, а также за день до окончания исследования, на мышах в подопытных группах, для изучения двигательной дисфункции и усвоения двигательного навыка. Способность данной мыши сохранять равновесие на перекладине и время, необходимое для прохождения расстояния в 1 метр является показателем их равновесия, координации, физического состояния и планирования моторики. Медную перекладину диаметром 12 мм помещали под углом 30°. Начало перекладины было освещено настольной лампой, тогда как платформа

(площадка) для внутреннего выхода помещалась в конце. Для начальных тренировочных исследований использовали более широкую перекладину, чтобы научить мышей сохранять равновесие и ходить до платформы. После тренировочных испытаний измеряли время задержки (латентности) мышей на расстоянии 1 м. Кроме того, с помощью наблюдения за походкой определяли первые симптомы двигательной дисфункции (скольжение лап и волочение живота). Статистический анализ оценок времени задержки осуществляли, используя двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для повторных измерений с поправкой Бонферрони для post-hoc сравнений.

Результаты

Хватательный рефлекс и тест на равновесие (прогулка по приподнятой перекладине)

Влияние IPN002 на хватательный рефлекс показано на Фигуре 31. Как показано на Фигуре 31, введение IPN002 снижало баллы хватательного рефлекса по сравнению с контрольным IgG. Влияние IPN002 на двигательную функцию, определяемое с помощью теста “прогулка по приподнятой перекладине”, показано на Фигуре 32. Как показано на Фигуре 32, введение IPN002 значительно снижало среднюю латентность (и, следовательно, улучшало двигательную функцию) по сравнению с контрольным IgG. Таким образом, введение IPN002 значительно снижает двигательный дефект у P301L Tay трансгенных мышей. С применением того же самого статистического метода было показано, что результаты введения PHF1 не достигли статистической значимости.

Уровни Tau

Определяли уровень свободного Tau (Tau, не связанного с IPN002) в CSF мышей P301L после введения контрольного IgG, PHF1 или IPN002. Уровень в CSF свободного Tau, не связанного с IPN002, определяли с использованием IPN001. Результаты показаны на Фигуре 33. Как показано на Фигуре 33, введение IPN002 снижало уровни свободного Tau (не связанного с IPN002) на 96% по сравнению с уровнями у мышей, получавших контрольный IgG.

ПРИМЕР 16: ВЛИЯНИЕ IPN002 НА ИНДУЦИРОВАННУЮ ЕТАУ ПОВЫШЕННУЮ ВОЗБУДИМОСТЬ НЕЙРОНОВ

Материалы и методы

Локальную фиксацию потенциала (метод пэтч–кламп) на целых клетках проводили на культурах человеческих первичных кортикальных нейронов. Нейроны перфузировали (2 мл/мин) искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей (мM): NaCl (140), KCl (2.5), MgCl₂ (2), CaCl₂ (2), Hepes (10), D-глюкоза (10), сахароза (20), корректировали pH= 7.4 мOsm = 310. Показания снимали с применением программы для сбора данных

pClamp-10.3 (Molecular Devices) и усилителя MultiClamp 700B (Axon Instrument; Foster City CA). Нанесение (струи): 1) eTay1a (аминокислоты 2-166); 2) фосфорилированного Tay или eTay с ингибиторами; 3) контрольного IgG; или 4) антител к Tay PHF1, IPN001 или Dako (поликлональное антитело к С-концевому Tay) осуществляли с помощью микроперфузационной системы MinisQuirt (AutoMate, Berkeley, CA). Анализ данных проводили в режиме оффлайн с применением аналитической программы Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Все показания снимали при температуре 34- 37°C.

Результаты

Результаты представлены на Фигурах 34 и 35. Как показано на Фигуре 34, IPN002 снижал индуцированную eTay1a гиперактивность нейронов. Ни контрольный IgG, ни “Dako” (поликлональное Ab к С-концевому Tay) не вызывали значительного снижения гиперактивности нейронов. Антитело PHF1 не снижало индуцированной eTay1a гиперактивности нейронов.

Влияние eTay1a на гиперактивность нейронов сравнивали с влиянием полноразмерного PHF1-реактивного фосфорилированного Tay (фосфо-Tay) на гиперактивность нейронов. Как показано на Фигуре 35, средний рисунок, полноразмерный PHF1-реактивный фосфо-Tay не индуцировал гиперактивность нейронов в 2 из 3 тестированных клеток; третья тестированная клетка проявляла только небольшую нейронную гиперактивность по сравнению с базовой (верхний рисунок). Напротив, eTay1a индуцировал нейронную гиперактивность во всех 3 проверенных клетках (нижний рисунок). Эти результаты графически показаны на Фигуре 36.

ПРИМЕР 17: Влияние IPN002 на уровень Аβ

Материалы и методы

Секреция Аβ полученными из iPSC кортикальными нейронами

Полученные из iPSC кортикальные нейроны (iPSC-CN) культивировали *in vitro*. iPSCs получали от здоровых субъектов; субъектов с наследственной болезнью AD с мутацией в белке пресенилине (PSEN1); субъекта с наследственной болезнью AD с мутацией в белке пресенилине (PSEN2); и субъекта со спорадической AD (sAD). После ~55-60 дней выращивания в культуре iPSC-CN сортировали по экспрессии L1-CAM (CD171), чтобы обогатить по зрелым кортикальным нейронам; отсортированные клетки выращивали в совместной культуре с нормальными человеческими астроцитами в течение 30 дней. После совместного культивирования в течение 30 дней iPSC-CN ещё в течение 25 дней обрабатывали ингибитором фермента, расщепляющего белок-предшественник бета-амилоида (BACE), контрольным IgG или IPN002 в различных концентрациях, меняя среду 2X/неделя. Кондиционированную среду собирали и тестировали с применением

высокочувствительного набора для анализа ELISA Millipore High Sensitivity Human Amyloid-beta 40 and Amyloid-beta 42 для обнаружения А β ₁₋₄₀ (“А β 40”) и А β ₁₋₄₂ (“А β 42”). А β 40 и А β 42 являются продуктами расщепления белка–предшественника амилоида; сенильные бляшки содержат как А β 42, так и А β 40.

Секреция А β первичными человеческими кортикальными нейронами

Человеческая фетальная кортикальная ткань, полученная в компании Advanced Bioscience Resources (Alameda, CA) удовлетворяла федеральным установкам по исследованиям на эмбрионах и Акту об анатомическом дарении. Ткань отмывали в буферном солевом растворе Хэнка (Cellgro) и растирали в присутствии 1 мг/мл ДНК-азы (EMD) и пропускали через клеточный фильтр с диаметром отверстий 100 мкм. После центрифугирования клеточный осадок ресуспендировали в 0.05% трипсин/EDTA (Invitrogen) в течение 20 мин при 37°C. Трипсин инактивировали, добавляя равный объём среды, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), и образец осторожно растирали опять же в присутствии ДНК-азы. После центрифугирования клетки ресуспендировали в среде для чашек Петри (нейробазальная среда Neurobasal, содержащая B27, Invitrogen) и считали. Клетки засевали на плашки (планшеты), культивировали в течение 5 недель и добавляли свежую среду, содержащую антитела в заданной концентрации в течение 10 дней, меняя среду каждые 3-4 дня, кондиционированную среду собирали после 10 дней обработки. Кондиционированную среду центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 минут, а затем проводили анализ ELISA для обнаружения А β 40 и А β 42.

Результаты

Результаты показаны на Фигурах 37-39.

Как показано на Фигуре 37, обработка iPSC-CN антителом IPN002 снижала уровни А β 40 и А β 42, секretируемых всеми iPSC-CN, тогда как контрольный IgG не снижал секрецию А β 40 или А β 42.

На Фигуре 38 проиллюстрирована зависимость доза–эффект на примере зависимости количества А β 40, секretируемого первичными человеческими кортикальными нейронами, от дозы различных антител. Как показано на Фигуре 38, инкубация первичных человеческих кортикальных нейронов с IPN001, IPN002 или hu-IPN002 (гуманизированный вариант IPN002) в концентрации 10 мкг/мл или 30 мкг/мл снижала количество секretируемого А β 40. Ни контрольный IgG, ни PHF1 не оказывали никакого значительного влияния на количество секretируемого А β 40.

На Фигуре 39 проиллюстрирована зависимость доза–эффект на примере зависимости количества А β 42, секretируемого первичными человеческими

кортикальными нейронами, от дозы различных антител. Как показано на Фигуре 39, инкубация первичных человеческих кортикальных нейронов с IPN001, IPN002 или hu-IPN002 (гуманизированный вариант IPN002) в концентрации 10 мкг/мл или 30 мкг/мл снижала количество секретируемого А β 42. Ни контрольный IgG, ни PHF1 не оказывали никакого значительного влияния на количество секретируемого А β 42.

ПРИМЕР 18: ЭПИТОПНОЕ КАРТИРОВАНИЕ ГУМАНИЗИРОВАННОГО ВАРИАНТА IPN002

Материалы и методы

Антитело или биотинилированный пептид разводили фосфатно–солевым буферным раствором (PBS). Ниже даются конечные концентрации: 1 мкг/мл гуманизированного варианта IPN002 (hu-IPN002); 1 мкг/мл rTau383 (полноразмерного рекомбинантного Tay); 5 мкг/мл (биотинилированный Пептид 1); и 5 мкг/мл биотинилированных Пептидов. 100 мкл 0.1% казеина в PBS добавляли в лунки многолуночного планшета. Добавляли 150 мкл 1 мкг/мл раствора hu-IPN002. Делали серийные разведения hu-IPN002 и покрывали лунки многолуночного планшета. В лунки, содержащие серийные разведения антитела, добавляли 100 мкл конъюгатов биотин–пептиды или биотин–полноразмерный Tay. Многолуночный планшет инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; а затем 2 раза в PBS.

В лунки добавляли вторичное антитело, конъюгированное со стрептавидин–пероксидазой хрена (HRP), и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; а затем 2 раза в PBS.

Добавляли субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) и инкубировали в течение 1-15 минут. Реакцию прекращали, добавляя 100 мкл 1 N серной кислоты. Оптическую плотность считывали при 450 нм.

Результаты

Результаты показаны на Фигуре 40. Данные, представленные на Фигуре 40, показывают, что биотин-Tay 13-24, биотин-Tay 15-24, биотин-Tay 15-44 и биотин-фосфо-Tay 15-24 (с фосфорилированным Туг, соответствующим аминокислоте 18 полноразмерного Tay) и полноразмерный Tay (rTau383), все эффективно связываются с hu-IPN002. Таким образом, hu-IPN002 связывает эпитоп в пределах Tay аминокислот 15-24 вне зависимости от статуса фосфорилирования Tyr-18.

ПРИМЕР 19: СВЯЗЫВАНИЕ АНТИТЕЛА С ТАУ В CSF

Было изучено связывание IPN002, PHF1, антитела, специфического к линейному фосфорилированному эпитопу, и контрольного антитела с Tay, присутствующим в CSF.

Был проведён анализ связывания, чтобы определить антитела, которые связывают Tay, присутствующий в CSF. Анализ схематически показан на Фигуре 41. Контрольный IgG, поликлональное антитело, специфическое к линейному фосфорилированному эпитопу (“полиAb-С-терминальный Tay”), PHF1 или IPN002 наносили на лунки многолуночного планшета. Антитело разводили в фосфатно–солевом буферном растворе (PBS). Далее даются конечные концентрации: 5 мкг/мл IPN002, IgG, PHF1 или полиAb-С-концевого Tay. В лунки многолуночного планшета добавляли 100 мкл 0.1% казеина в PBS. Добавляли 100 мкл человеческой CSF и инкубировали в течение 1 часа при RT. В лунки добавляли 100 мкл смеси конъюгатов биотин-BT2 + биотин-HT7. BT2 представляет собой мышиное моноклональное антитело, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 194-198 человеческого Tay. HT7 представляет собой мышиное моноклональное антитело, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 159-163 человеческого Tay. Многолуночный планшет инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; с последующими 2 отмывками в PBS.

В лунки добавляли вторичное антитело, конъюгированное со стрептавидин–пероксидазой хрена (HRP) и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; с последующими 2 отмывками в PBS. Добавляли субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) и инкубировали в течение 1-15 минут. Реакцию прекращали, добавляя 100 мкл 1 N серной кислоты. Оптическую плотность считывали при 450 нм.

Количественный анализ проводили с известными количествами полноразмерного фосфо-Tay или с известными количествами eTay1a (аминокислоты 2-166 Tay). Как показано на Фигуре 41, нижний рисунок, анализ проводили с использованием полноразмерного Tay (нижний левый рисунок) или eTay-1a (нижний правый рисунок) в концентрациях 0 нг/мл, 0.16 нг/мл, 0.8 нг/мл, 4 нг/мл, 20 нг/мл и 100 нг/мл. Как показано на Фигуре 41, нижний левый рисунок, IPN002, полиAb-С-концевой Tay и PHF1 связывают полноразмерный Tay. Как показано на Фигуре 41, нижний правый рисунок, только IPN002 связывает eTay1a.

Вышеописанный анализ проводили с целью проверить (тестировать) связывание антител полиAb-С-концевой Tay, PHF1 и IPN002 с Tay, присутствующим в человеческой CSF от: 1) контрольных (здоровых) пациентов; 2) MCI пациентов; 3) пациентов с “мягкой” формой AD (“мягкая”, “mild”); 4) пациентов с умеренной формой AD (“умеренная”, “moderate”); и пациентов с тяжёлой формой AD. Результаты показаны на Фигуре 42. Как показано на Фигуре 42, Tay, присутствующий в CSF, связывается с помощью IPN002, но

не с помощью антитела pAb-Tay линейный эпитоп и не с помощью PHF1. Результаты показывают, что: 1) N-концевые фрагменты Tay присутствуют в CSF; 2) полноразмерный Tay был обнаружен в CSF; и 3) никаких С-концевых фрагментов Tay, которые включают BT2 и HT7 эпитопы, не было обнаружено в CSF.

ПРИМЕР 20: IN VIVO ДЕЙСТВИЕ АНТИТЕЛА IPN002

Результаты были получены в процессе шестимесячного изучения эффективности антитела к Tay на P301L Tay трансгенных мышах. Было обнаружено, что IPN002 глобально снижает прогрессирование заболевания, что показывают следующие наблюдения: резкое снижение уровня свободного Tay в CSF, пониженные уровни белкового маркёра астроглиоза, уменьшение патологического Tay и фосфо-Tay эпитопов во многих областях головного мозга и улучшение показателей поведенческих/функциональных нарушений. IPN002 показал такие же или даже лучшие результаты, чем антитело к Tay PHF1. Наконец, было получено *in vivo* доказательство нового механизма действия секреции Tay: регуляция уровней амилоида-бета по принципу положительной обратной связи. В данном исследовании чётко показано различие способности антитела к eTay, IPN002, по сравнению с PHF1, модулировать уровни амилоида-бета.

Материалы и Методы

Исследования на животных

В исследовании использовали P301L трансгенную мышнюю модель. P301L трансгенная мышь содержит в качестве трансгена 4R2N изоформу человеческого Tay, мутантного по P301L, экспрессия которого направляется нейроспецифическим мышним промотором гена Thy1 (нейроспецифическая экспрессия). У P301L трансгенной модели наблюдается возрастное гиперфосфорилирование Tay (AT8 и AT100) в спинном мозге, в стволе головного мозга, среднем мозге и в коре головного мозга. В молекуле гиперфосфорилированного Tay наблюдаются конформационные изменения, которые приводят к агрегации Tay, и у мышей появляются нейрофибриллярные клубки, начиная с 6 месяцев, хотя время начала колеблется в широких пределах. Одновременно с патологией у этих мышей постепенно развиваются двигательные дисфункции, такие как хватательный рефлекс задних лап, пониженная подвижность при прогулке по приподнятой перекладине (тест на равновесие), и требуется преждевременное умерщвление в возрасте 8-11 месяцев. Terwel et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 280:3963.

100 произвольно разделённым на группы мышам раз в неделю вводили i.p. антитело начиная с 3.5- месячного возраста в течение 6 месяцев до 9.5- месячного

возраста. Результаты в группе, получавшей 20 мг/кг (mpk) IPN002, сравнивали с результатами в группах, получавших в качестве отрицательного контроля антитело, 20 mpk IgG1, и антитело к Tay, 10 mpk PHF1. PHF1 представляет собой мышью моноклональное антитело, которое распознаёт эпитоп, включающий фосфо-Ser³⁹⁶ и фосфо- Ser⁴⁰⁴. Santacruz et al. (2005) *Science* 309:476. У живых мышей проверяли выполнение теста на хватательный рефлекс и теста “прогулка по приподнятой перекладине”. Мышей, у которых болезнь быстро прогрессировала в сторону последней стадии, преждевременно умерщвляли (до наступления 9.5-месячного возраста) в соответствии с установленными критериями. Извлекали сыворотку, CSF, гиппокамп, кору головного мозга, средний мозг и задний мозг; и сагиттальные срезы мозга делали для гистопатологии. Уровни антитела определяли в сыворотке и в CSF; определяли уровень тотального Tay и свободного Tay (Tay, не связанного с IPN002; “Tay, свободного от IPN002”) в CSF; проводили биохимические/гистологические анализы на человеческий и мышьный Tay; и анализировали мышьный амилоид-бета, воспалительный и синаптический белковый маркёр и изменения экспрессии генов воспалительного, синаптического маркёров и маркёров нейрональной активности. Все анализы проводили слепым методом.

Число мышей, участвовавших в данном исследовании, составляло 25-33 мышей на подопытную группу и 10 на базовую группу. Всем мышам, зарезервированным для данного исследования, с помощью компьютера был присвоен случайный номер и определена обработка. Группы мышей представлены в Таблице 7.

Таблица 7

Группа	N	Линия	Обработка
1	10	hTau.P301L-Tg	Никакой (базовая группа)
2	32	hTau.P301L-Tg	20 mpk mIgG1 в носителе
3	25	hTau.P301L-Tg	10 mpk PHF1 в носителе
4	33	hTau.P301L-Tg	20 mpk IPN002 в носителе

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с установками биоэтики, которые полностью соответствуют международным требованиям к содержанию и использованию лабораторных животных. В Таблице 8 приводятся показатели обработки.

Таблица 8

Путь введения	i.p.
Объём, концентрация дозы	10 мл/кг; 1 мг/мл; 10 mpk/день
Частота введения (обработки)	Один раз в неделю
Продолжительность обработки	Вплоть до 6 месяцев в зависимости от выживаемости

Массу тела определяли раз в неделю в продолжение обработки и при умерщвлении. Хватательный рефлекс регистрировали еженедельно, начиная с 7-месячного возраста и далее. Начиная с 7-месячного возраста и далее дважды в неделю проверяли подвижность в клетке, потерю в весе и первые признаки (симптомы) хватательного рефлекса задних лап.

Хватательный рефлекс. Для оценки хватательного рефлекса мышей держали за основание хвоста около десяти секунд. Хватательный рефлекс оценивали по 3^x-балльной шкале: 0. Задние лапы растянуты и пальцы вытянуты (разогнуты). 1. Одна задняя лапа частично втянута (сжата) > 50% времени. 2. Обе задние лапы частично втянуты (сжаты) > 50% времени. 3. Обе задние лапы полностью втянуты (сжаты) > 50% времени. Хватательный рефлекс передней лапы получал оценку 0. Передние лапы вытянуты далеко вперёд от тела. 1. Одна передняя лапа частично втянута (сжата) > 50% времени. 2. Обе передние лапы частично втянуты (сжаты) > 50% времени. 3. Обе передние лапы полностью втянуты (сжаты), неподвижны, атрофия мышечной ткани, мышь “молится”. Мышей, у которых наблюдается резко выраженный хватательный рефлекс (в тяжёлой форме), рано умерщвляли.

“Прогулка по приподнятой перекладине”. Тест на равновесие, “прогулку по приподнятой перекладине”, проводили в возрасте 7, 8, 8.5 и 9 и 9.5 месяцев для изучения двигательной дисфункции и усвоения двигательного навыка. Способность мыши сохранять равновесие на перекладине и время, необходимое для прохождения расстояния в 1 метр является показателем их равновесия, координации, физического состояния и планирования моторики. Медную перекладину диаметром 12 мм помещали под углом 30°. Начало перекладины было освещено настольной лампой, а платформа (площадка) для внутреннего выхода помещалась на дальнем конце. После тренировочных испытаний измеряли время задержки (латентности) мышей. Кроме того, определяли скольжение лап и волочение живота.

Животных базовой группы умерщвляли перед началом исследования. Мышей в подопытных группах, у которых наблюдалась резко выраженный хватательный рефлекс, пониженная масса тела и/или агональное состояние (агония), прежде временно умерщвляли (раннее умерщвление). Остальных мышей умерщвляли после обработки (исследования) в течение 6 месяцев (позднее умерщвление).

Таблица 9

	изофлурана.
Перфузия	Осуществляли доступ к грудной полости для перфузии посредством транскардиальной перфузии ледяным физиологическим раствором в течение 3 минут через левый желудочек. Делали разрез правого предсердия в качестве пути оттока.
Левое полушарие	Разрезали на гиппокамп, кору, средний мозг, мозжечок, ствол мозга и остальное, замораживали в жидким азоте.
Правое полушарие	Постфиксировали в течение ночи в PBS с 4% параформальдегида и хранили в PBS с 0.1% азота натрия при 4°C.
CSF	Собирали через надрез в шейных мышцах между черепом и первым шейным позвонком. Большую цистерну прокалывали иглой 26, собирали 10-20 мкл CSF, центрифугировали при 10,000 об/мин при 4°C и хранили при -80°C.
Кровь/плазма	Собирали путём сердечной пункции в EDTA-пробирки, центрифугировали при 2000 об/мин и при 4°C 15 минут и хранили при -70°C.
Масса тела	Определяли после умерщвления.

Свободное антитело PHF1 в плазме количественно определяли, добавляя плазму в соответствующем разведении в планшеты, покрытые плёнкой Tay, и детектируя методом ELISA с HRP-антителом к мышиному IgG и TMB. Чувствительность анализа свободного PHF1 была недостаточной для того, чтобы количественно определить уровни свободного PHF1 в CSF.

Свободное антитело IPN002, в плазме и в CSF, количественно определяли, добавляя плазму или CSF в соответствующем разведении и детектируя методом ELISA с HRP-антителом к мышиному IgG и TMB.

Тотальный Tay в CSF количественно определяли методом ELISA сэндвич-типа, используя как сенсибилизацию антителом к Tay, так и обнаружение антител к Tay, которые, как было показано, не конкурируют ни с IPN002, ни с PHF1.

Свободный Tay (свободный от IPN002) в CSF количественно определяли гомогенным методом ELISA, используя два (иммобилизованных) антитела к Tay для захвата Tay в CSF. Одно из этих антител конкурирует с IPN002 и, следовательно, не будет реагировать с Tay, который предварительно был связан с IPN002, в CSF.

Гиппокамп и кору фракционировали гомогенизацией в 10 (**weight?**) объемах холодного TBS/ коктейля ингибиторов протеаз/фосфатаз (Roche). Гомогенат получали, центрифугируя дебрис при 10,000 об/мин в течение 15 минут. Содержание белка ВСА определяли на гомогенатах; все гомогенаты разводили до концентрации 1 мг/мл и соответствующие фракции разводили эквивалентно. Порцию гомогената центрифугировали 1 час при скорости 100,000 об/мин при 4°C, получая растворимую фракцию (S1) и нерастворимый осадок (гранулы, пеллеты). Нерастворимые гранулы ресуспендировали в среде 1% раствор саркозила/коктейль ингибиторов протеаз/фосфатаз (Roche) и центрифугировали 1 час при скорости 100,000 об/мин. Солубилизированные с

помощью саркозила супернатанты метили (P1); не солюбилизованные с использованием саркозила осадок ресуспендировали и метили (P2). Задний мозг фракционировали аналогичным способом за исключением того, что для солюбилизации осадка P1 применяли раствор с высоким содержанием соли (0.85M NaCl), а затем 1% раствор саркозила.

Гомогенный анализ ELISA человеческого Tay конкретно относится к человеческому p202/205 Tay, и он применялся для определения уровней человеческого Tay в гомогенате, фракциях S1, P1 и P2 в гиппокампе, коре и заднем мозге.

Гомогенный анализ ELISA человеческого AT8 конкретно относится к человеческому Tay, и он применялся для определения уровней человеческого AT8 в гомогенате, фракциях S1, P1 и P2 в гиппокампе, коре и заднем мозге.

SDS-PAGE с Вестерн-блотанализом с HT7, IPN001, Dako поликлональный-Tay, AT8, AT100, анти-p262, анти-p396 и AD2, GFAP, Iba1, синапсином проводили на фракциях гиппокампа, коры и/или заднего мозга (гомогенат, S1, P1 и/или P2). На каждый гель наносили один или более лизатов для контроля, чтобы гарантировать адекватную нормализацию гелей. Все полосы были нормализованы по β-актину в соответствующем образце гомогената. Антитела и их мишени показаны в Таблице 10.

Таблица 10

Антитело	Мишень
IPN001	Tay и eTay
HT7	Человеческий Tay
Dako поликлональное к Tay	Человеческий и мышиный Tay
AT8	Человеческий и мышиный p202/205 (fosфорилированный по Ser202 и Thr205) Tay
AT100	Человеческий и мышиный p212 (fosфорилированный по Ser212) Tay
Анти-p262	Человеческий p262 (fosфорилированный по Ser262) Tay
AD2	Человеческий и мышиный p396 (fosфорилированный по Ser396) Tay
p396	Человеческий и мышиный p396 (fosфорилированный по Ser396) Tay
Глиофибриллярный кислый белок (GFAP)	Мышиный GFAP на астроцитах
Связывающая ионизированный кальций адаптерная молекула 1 (Iba1)	Мышиный Iba1 на микроглии
Синапсин	Мышиный синапсин (синаптический белок)

Для гистопатологии 6/32 рандомизированные сагиттальные срезы полушарий окрашивали на AT8 и AT100; сигналы проявляли с помощью DAB. Были сделаны количественные определения как на смежной с субталамическим ядром неопределенной

зоне (bregma 2.08-1.12), так и на промежуточном ядре мозжечка (передняя и задняя доля), смежном латеральном ядре мозжечка (IntA/P/LAT; bregma 2.28-1.32) (слепая оценка).

Анализ ELISA мышного амилоида-бета (как А β 40, так и А β 42) проводили для конкретного обнаружения А β 40 и А β 42 в гомогенатах мозга мышей. Анализ ELISA на белок А β 42 мыши был недостаточно чувствителен, чтобы надёжно определить его уровни в гомогенатах мозга мышей. Анализ ELISA на мышиный А β 40 позволил определять уровни А β 40 в линейной области. Анализ ELISA мышного А β 40 применяли для определения уровней А β 40 в гомогенатах и растворимых (S1) фракциях для всех групп.

Анализ TaqMan проводили на маркёрах воспаления, синаптических маркёрах и маркёрах нейрональной активности. В Таблице 11 представлен список маркёров.

Таблица 11

Ген	Функция
APP	Белок-предшественник бета-амилоида: мутантный/причинный у некоторых fAD пациентов
Человеческий Tay	МТВ белок; агрегирует при AD
Arg	Нейрональная активность
Синапсин	Синаптический белок
Синаптофизин	Синаптический белок
Кальбиндин	Синаптический белок
Нейропептид Y	Нейрональная активность
Cox2	Воспаление
GFAP	Воспаление -астроцит
Iba1	Воспаление -микроглия
IL-1b	Воспаление
P67phox	Воспаление
Pg91phox	Воспаление
PBR1	Воспаление
TNFa	Воспаление

Статистика

Статистический анализ лонгитюдных данных, полученных при изучении хватательного рефлекса и прогулки по приподнятой перекладине, проводился независимым специалистом по статистике. Коротко говоря, определяли (тангенс угла) наклон кривой для каждой мыши как в тесте хватательного рефлекса, так и при прогулке по приподнятой перекладине, и эти коэффициенты применялись для того, чтобы определить, имеются ли значимые различия между группами. Множество методов применяется для определения наклона кривых и значимости. Для хватательного рефлекса эти методы включают Анализ завершённых данных лонгитюдным методом, Объединённую модель с корректировкой пропущенных данных и Байесовский анализ

упорядоченных лонгитюдных данных. Для прогулки по приподнятой перекладине эти анализы включали Анализ завершённых лонгитюдных данных, Объединённую модель с корректировкой пропущенных данных, Анализ с использованием 30–секундных значений лонгитюдных данных, Байесовский лонгитюдный анализ с пропущенными данными и Alive, но не перекрёстный анализ.

Статистический анализ по определению значимости для биохимии, гистологии и генной экспрессии проводили на целой группе, группах с ранним умерщвлением и с поздним умерщвлением с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением post-hoc теста Даннета. Применили также t-критерий (критерий Стьюдента) для прогрессирования заболевания (группы: базовая, возраст 3.5 месяцев, по сравнению с подопытной, получавшей IgG, возраст 9.5 месяцев) в качестве “компаратора” значимости, полученной однофакторным дисперсионным методом, ANOVA. Когда для PHF1 или для IPN002, по-видимому, наблюдалась серьёзная тенденция к изменениям, но этого не показывал однофакторный анализ ANOVA, t-критерий для сравнения IgG с PHF1 или IPN002 применяли единственно для того, чтобы определить, действительно ли выясняются паттерны тенденции для этого конечного результата без достижения значимости однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

Для того чтобы определить, какие из 116 конечных результатов лучше всего коррелируют друг с другом, применялась матричная корреляция; и “корреляторами”, позволяющими достичь наивысшей корреляции, были ранжированные на основе их значений r^2 и значений p.

Результаты

Уровни антител и достижение цели

Перед умерщвлением отбирали плазму и CSF. Определяли уровни свободного IPN002 и свободного PHF1 в плазме и уровни свободного IPN002 в CSF. Анализ свободного PHF1 был недостаточно чувствителен для количественного определения уровней свободного PHF1 в CSF. Также было получено достаточно CSF для определения уровней как тотального Tau, так и свободного Tau (свободного от IPN002).

Уровни свободного IPN002 и свободного PHF1 в плазме

P301L Tay трансгенным мышам вводили 20 mpk IgG, 20 mpk IPN002 или 10 mpk PHF1. Эти дозы были выбраны на основании результатов, полученных в пункте Достижение цели, исследование №1. Итоговые данные представлены в Таблице 12.

Таблица 12

Антитело	Достижение цели Исследование №1		Исследование эффективности	
	Вводимая доза	Средние уровни свободного	Вводимая доза	Средние уровни свободного

		антитела (Плазма)		антитела (Плазма)
IPN002	10 mpk в течение 4 недель-> 20 mpk в течение 4 недель	0.65 мкМ	20 mpk в течение 26 недель	0.9 -/+ 0.26 мкМ
PHF1	10 mpk в течение 8 недель	0.65 мкМ	10 mpk в течение 26 недель	0.55 -/+ 0.05 мкМ

Было найдено, что в исследовании №1 пункта Достижение цели, где после введения 10 mpk IPN002 в течение 4 недель вводили 20 mpk IPN002 ещё в течение 4 недель, средний уровень свободного IPN002 в плазме составлял 0.65 мкМ. Такая же концентрация, 0.65 мкМ свободного PHF1, была получена при введении постоянной дозы 10 mpk PHF1 в течение 8 недель. В данном исследовании, как показано в Таблице 12, средние концентрации в плазме были следующие: 0.55 мкМ свободного PHF1 и 0.9 мкМ IPN002. Таким образом, средние уровни в плазме свободного IPN002 были выше средних уровней свободного PHF1 в плазме.

Уровни свободного IPN002 в CSF

Как показано в Таблице 13, в среднем в CSF P301L Tay мышей, получавших IPN002, содержалось 0.9 нМ свободного IPN002. Это соответствует 0.1% свободного IPN002 в соотношении CSF:плазма; т.е. концентрация IPN002 в CSF составляла 0.1% от концентрации IPN002 в плазме (0.9 нМ в CSF; 0.9 мкМ в плазме). Значение 0.1% антитела в CSF согласуется с процентным содержанием, определённым для других антител, поступающих в мозг и попадающих (“сбрасываемых”) в CSF после периферического введения. Однако анализ на свободный IPN002 даёт сведения только об IPN002, который не связан с Tay. В CSF Tay связан с IPN002; следовательно, величина 0.1% ниже содержания тотального IPN002 в CSF. Расчёты, т.е. суммирование уровней свободного IPN002 и уровней IPN002, связанного с Tay, показывают, что уровни тотального IPN002 в CSF составляют ~0.2% от плазматических уровней. Как отмечалось в разделе Методы, анализ на свободный PHF1 недостаточно чувствителен для количественного определения уровней свободного PHF1 в CSF.

Таблица 13

Антитело	Исследование эффективности	
	Средняя концентрация свободного антитела (Плазма)	Средняя концентрация свободного антитела (CSF)
Свободное IPN002	0.9 -/+ 0.26 мкМ	0.9 -/+ 0.28 нМ

Тотальный Tay в CSF

Уровни тотального Tay в CSF количественно определяли для того, чтобы выяснить, действительно либо PHF1, либо IPN002 изменяют эти уровни или нет. Как показано на Фигуре 43, уровни тотального Tay в CSF незначительно меняются при введении PHF1 или IPN002. Этот результат является ожидаемым на основании данных, полученных в исследовании Достижение цели.

Фигура 43: Уровни тотального Tay в CSF P301L Tay трансгенных мышей определяли количественно иммуноферментным анализом “сэндвич” ELISA антител к Tay. Как показано на Фигуре 43, уровни Tay в CSF с возрастом заметно повышались (сравните уровень у 3^x-месячных мышей в базовой группе с мышьям IgG). Ни PHF1, ни IPN002 не изменяли уровни тотального Tay.

Свободный Tay (от IPN002) в CSF

Анализ на свободный Tay (от IPN002) в CSF, как описано в разделе Методы, представлял собой анализ ELISA, в котором одно из двух антител к Tay конкурирует с IPN002; следовательно, анализ не позволяет обнаружить Tay, связанный с IPN002. Этот анализ показывает, действительно ли IPN002 поступил в мозг и в CSF и связался со своей мишенью (т.е. связался с Tay). Если IPN002 связался с мишенью, сигнал в анализе будет меньше (слабее). Этот анализ является специфическим к Tay, свободному от IPN002, и, следовательно, не обнаруживает свободный Tay (от PHF1). Как показано на Фигуре 33, уровни свободного Tay (от IPN002) повышаются при прогрессировании заболевания, что согласуется с данными, представленными выше. PHF1 не влияет на уровни свободного Tay. Напротив, введение IPN002 привело в результате к уменьшению сигнала уровня свободного Tay (от IPN002) на 96%. Эти результаты показывают, что IPN002 полностью связан со своей мишенью, Tay в CSF.

Биохимическое и гистологическое исследование Tay и Фосфо-Tay

Как описано в разделе Методы, гиппокамп, кора и задний мозг делили на фракции гомогенат, растворимую фракцию (солюбилизированную при участии саркозила) и нерастворимую фракцию (не растворимую с помощью саркозила). Фракции анализировали как на человеческий, так и на мышьям Tay и на несколько эпитопов фосфо-Tay (AT8, AT100, p262, p396 и AD2), которые являются гиперфосфорилизованными в мозгу больных, страдающих болезнью Альцгеймера. Как показано на Фигурах 44 A-H, введение IPN002 снижало уровни AT8 в гиппокампальном гомогенате (Фигура 44A), гиппокампальной фракции S1 (Фигура 44B), гиппокампальной фракции P1 (Фигура 44C), гиппокампальной фракции P2 (Фигура 44D), кортикальном гомогенате (Фигура 44E) и кортикальной фракции P1 (Фигура 44G) по сравнению с

введением мышного IgG контрольного антитела. Данные, приведённые на Фигуре 44А-Н, показывают, что введение IPN002 снижало уровни AT8 до уровней, аналогичных результатам или превышающим результаы после введения (обработки) PHF1. Данные, показанные на Фигурах 44А-Н, были нормализованы по ВСА.

Как показано на Фигуре 45А, обработка (введение) с помощью IPN002 снижала уровень человеческого p396-Tay во фракции S1 коры по сравнению с введением мышного IgG, контрольного антитела. Как показано на Фигурах 45В и 45С, введение IPN002 снижало уровень фосфо-Tay S262 в гомогенате коры (Фигура 45В) и в кортикальной фракции S1 (Фигура 45С) по сравнению с введением мышного IgG, контрольного антитела. Как показано на Фигурах 45Д и 45Е, введение IPN002 снижало уровень мышного p396-Tay в кортикальной фракции S1 (Фигура 45Д) и снижало уровень мышного AT100 во фракции S1 коры (Фигура 45Е) по сравнению с введением мышного IgG, контрольного антитела.

Гистопатологию Tay (AT8 и AT100) изучали на двух отдельных ядрах в заднем мозге, на смежной с субталамическим ядром неопределенной зоне (STH) и на промежуточном ядре мозжечка (передняя и задняя доля), смежном латеральном ядре мозжечка (IntA/P/LAT). Как показано на Фигуре 46, IPN002, у поздно умерщвлённых мышей заметно увеличена AT8 болезненная патология. В случае PHF1 проявлялась тенденция к снижению, но не наблюдалось заметного улучшения гистопатологии Tay. Как показано на Фигуре 47, введение IPN002 улучшило AT100 и MC1 патологию по сравнению с контрольным IgG.

Воспаление

У моделей AD и таупатии развиваются как астроглиоз, так и микроглиоз. Однако, роль, которую играют в заболевании астроциты и микроглия, не совсем ясна. Если астроциты или микроглия активируются в P301L Tay трансгенных моделях, такая активация является следствием сверхэкспрессии мутантного Tay. Было высказано предположение, что секрецируемый Tay вызывает AD патологию. Если секрецируемый Tay вызывает AD патологию, тогда он также мог, предположительно, индуцировать активацию глиальных клеток. По этой причине изучался вопрос, повышен ли у P301L трансгенной мышкой модели содержание белков, уровень которых повышается при астроглиозе (GFAP) или микроглиозе (Iba1).

Как показано на Фигурах 48А и 48В, уровни белка GFAP повышаются при прогрессировании заболевания как в гиппокампе, так и в коре. Эти результаты показывают, что либо астроциты активируются в гиппокампе и в коре, либо что они инфильтровали эти участки мозга. Введение IPN002 значительно снижали уровни белка

GFAP как в гиппокампе, так и в коре; это демонстрирует, что введение IPN002 снижало обусловленное заболеванием увеличение (выраженности) астроглиоза. PHF1 заметно снижал уровни GFAP в гиппокампе, но не в коре.

Уровни белка Iba1, маркёра микроглии, количественно определяли как в гиппокампе, так и в коре. Как показано на Фигурах 49А и 49В, уровень Iba1 при прогрессировании заболевания не повышается в гиппокампе, но повышается в коре. Введение IPN002 не влияло на болезненный рост уровней белка Iba1. Напротив, обработка с помощью PHF1 значительно снижала уровни белка Iba1. Эти результаты дают основание предположить, что механизмы действия IPN002 и PHF1 различны.

Модуляция уровня амилоида-бета

Как показано в Примере 17, обработка iPSC-CN антителом IPN002 снижала уровни А β 40 и А β 42, секretируемых всеми iPSC-CN, тогда как контрольный IgG не снижал секрецию А β 40 или А β 42. Затем определяли, действительно ли IPN002 также модулирует уровни А β *in vivo*. У мышной модели P301L отсутствует сверхэкспрессия человеческого APP; поэтому количественно определяли уровни мышного А β . Чувствительность анализа ELISA на мышний А β 42 была недостаточной для измерения уровней А β 42 в этих гомогенатах. Однако, анализ А β 40 ELISA был достаточно чувствителен, и поэтому его применяли для определения уровней мышного А β 40 во фракциях гомогената и супернатантов. Уровни мышного А β 40 повышаются при прогрессировании заболевания. Наблюдаемое повышение уровней А β 40 могло быть Тау-зависимым и/или могло зависеть от возраста. Как показано на Фигурах 50А и 50В, обработка с помощью IPN002 снижала уровни А β 40 как в гомогенате (Фигура 50А), так и в растворимой фракции (Фигура 50В).

Результаты, представленные на Фигурах 50А и 50В, показывают, что сверхэкспрессия Тау (возможно, связанная со старением) вызывает обусловленное прогрессированием заболевания повышение уровней А β 40. Данные наводят на мысль, что секretируемый Тау является причинным фактором, вызывающим рост уровней А β , который IPN002, в свою очередь, ингибирует, блокируя функцию eTau. И напротив, антитело PHF1, не являющееся антителом, связывающим eTau, не оказывает никакого влияния на уровни А β .

Двигательная функция

Определяли влияние введения IPN002 на двигательную функцию, проводя тесты “хватательный рефлекс” и “прогулка по приподнятой перекладине”. Результаты представлены на Фигурах 31, 32, 51 и 52.

Как показано на Фигуре 31, введение IPN002 улучшало оценки хватательного рефлекса по сравнению с мышным IgG, контрольным антителом.

Как показано на Фигурах 32 и 51, введение IPN002 улучшало средние результаты латентности (запаздывания) в teste “прогулка по приподнятой перекладине” (Фигура 32) и снижала процент мышей, которые не могли пройти по перекладине (Фигура 51), по сравнению с мышиным IgG, контрольным антителом.

ПРИМЕР 21: Эпитопное картирование

Анализы связывания с пептидами и конкурентные анализы проводили как описано выше, в Примере 18.

Были использованы следующие пептиды:

IPIG-1: EVMEDHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO:81; аминокислоты 9-24 Tay);

IPIG-2: DHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO:49; аминокислоты 13-24 Tay);

IPIG-3: AGTYGLGKD (SEQ ID NO:82; аминокислоты 15-22 Tay);

IPIG-4: AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTAGLK (SEQ ID NO:50; аминокислоты 15-44 Tay);

PAD пептид: AEPRQEFEV рMEDHAGTY (SEQ ID NO:80; аминокислоты 2-18 Tay).

Результаты показаны на Фигурах 53-55.

На Фигуре 30 показано, что небиотинилированные Tay-пептиды конкурируют за связывание с биотинилированными формами Tay. На верхнем рисунке показана конкуренция биотинилированного Tay 13-24 пептида (IPIG-2; SEQ ID NO:49) с небиотинилированным Tay 13-24 за связывание с hu-IPN002.

На Фигуре 52 показано, что полноразмерный Tay, IPIG-1, IPIG-2 и IPIG-4 связывались антителом hu-IPN002. IPIG-3, в молекуле которого отсутствуют остатки 23 и 24, не связывались с антителом hu-IPN002, так же как и PAD. Следовательно, остатки 23 и 24, по-видимому, необходимы для связывания с антителом hu-IPN002.

На Фигуре 53 показано, что eTay-4 пептид связывает hu-IPN002; однако, пептиды PAD (Tay 2-18), Tay 15-22, Tay 19-28 и Tay 21-31 не связывали hu-IPN002.

Эти результаты показывают, что остатки 15-24, по-видимому, необходимы для связывания с антителом hu-IPN002.

ПРИМЕР 22: ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО eTAU4 НА УРОВНИ Аβ40 И Аβ42 В HFNs

Определялось воздействие синтетического eTay4-полипептида на продуцирование Аβ40 и Аβ42 человеческими фетальными нейронами (HFNs). HFNs выращивали в культуральной среде, содержащей 500 нМ eTay4 (SEQ ID NO:48), 1 мкМ рекомбинантного Tay-383 или контрольного полипептида-имитатора, мнимого полипептида (“mock”), в течение 5 дней (d05), 10 дней (d10), 15 дней (d15) или 20 дней (d20). Количество Аβ40 и Аβ42 в культуральной среде определяли как описано выше. Результаты показаны на Фигурах 55A и 55B.

Как показано на Фигуре 55А, количество А β 40 в 15-дневной и в 20-дневной HFNs-кондиционированной среде уменьшалось в случае HFNs, которые обрабатывались с помощью 500 нМ eTau4. Как показано на Фигуре 55В, количество А β 42 в 15-дневной и в 20-дневной культуральной среде от HFNs повышалось в случае HFNs, которые обрабатывались с применением 500 нМ eTau4.

ПРИМЕР 23: ВОЗДЕЙСТВИЕ АНТИТЕЛ К ТАУ НА УРОВНИ А β 40 И А β 42 В HFNs

Было изучено влияние антител к Tau на производство А β 40 и А β 42 в клетках HFNs. HFNs выращивали в культуральной среде, содержащей различные антитела к Tau или контрольные антитела в конечной концентрации 30 мкг/мл, в течение 20 дней.

Ниже представлены контрольные антитела и антитела к Tau:

- 1) mo IgG: (неспецифический мышиный IgG);
- 2) hu IgG (неспецифический человеческий IgG);
- 3) IPN002 (антитело к Tau, которое распознаёт эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Tau, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображённая на Фигуре 61);
- 4) гуманизированный вариант IPN002 (hu-IPN002);
- 5) гуманизированный вариант IPN002 (hu-IPN002 v1);
- 6) гуманизированный вариант IPN002 (hu-IPN002 v2);
- 7) TNT-1 – мышье моноклональное антитело, полученное при использовании Tau 2-18 пептида в качестве иммуногена (см., например, Kanaan et al. ((2011) *J. Neurosci.* 31:9858)), где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображённая на Фигуре 61;
- 8) 5A6 – мышье моноклональное антитело, которое, как сообщалось, распознаёт эпитоп в пределах аминокислот 19-46 Tau (см., например, Horowitz et al. (2004) *J. Neurosci.* 24:7895), где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображённая на Фигуре 61;
- 9) MC1 – мышье моноклональное антитело, которое распознаёт эпитоп в пределах аминокислот 28-126 Tau, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображённая на Фигуре 61;
- 10) HT7 – мышье моноклональное антитело, которое, как сообщалось, распознаёт эпитоп, который включает аминокислоты PPGQK (аминокислоты 159-163 Tau; см., например, патент США № 7,387,879) Tau, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображённая на Фигуре 61;
- 11) BT2 – мышье моноклональное антитело, которое, как сообщалось, распознаёт эпитоп, который включает аминокислоты RSGYS (аминокислоты 194-198 Tau;

см., например, патент США № 6,232,437) Tay, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображённая на Фигуре 61;

12) Tau5 – мышью моноклональное антитело, которое, как сообщалось, распознаёт эпитет в пределах Ser²¹⁰-Arg²³⁰ (см., например, Carmel et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:32789), где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображённая на Фигуре 61;

13) IPN008 – антитело к Tay, которое распознаёт эпитет в С-концевой области Tay;

14) PHF1 – мышью моноклональное антитело, которое, как сообщалось, распознаёт эпитет, который включает фосфо-Ser³⁹⁶ и фосфо-Ser⁴⁰⁴ (см., например, Santacruz et al. (2005) Science 309:476), где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображённая на Фигуре 61;

15) DC39n1 – мышью моноклональное антитело, которое распознаёт эпитет в пределах 2N вставки Tay;

16) DA31 – мышью моноклональное антитело, которое распознаёт эпитет в пределах аминокислот 150-190 Tay, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображённая на Фигуре 61; и

17) Dako – поликлональное антитело, которое распознаёт эпитет в пределах аминокислот 243-441 Tay, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображённая на Фигуре 61.

Схематическое изображение локализации эпитетов, распознаваемых различными антителами, представлено на Фигуре 59. На Фигуре 61 показано выравнивание аминокислотной последовательности eTay4, которая не включает 2N вставку, с аминокислотной последовательностью 2N4R формы Tay, которая не включает 2N вставку (аминокислоты с 45 по 102 2N4R Tay).

В конце 20-дневного периода выращивания количество Аβ40 и Аβ42 в культуральной среде определяли как описано выше. Результаты представлены на Фигурах 56А и 56В.

Как показано на Фигуре 56А, антитела, специфические к эпитету в пределах аминокислот 2-68 eTay, снижают производство Аβ₄₀ в клетках HFNs. Как показано на Фигуре 56В, антитела, специфические к эпитету в пределах аминокислот 2-68 eTay, снижают производство Аβ₄₂ в клетках HFNs.

Изучалось воздействие антитела к Tay DA31 на производство Аβ40 и Аβ42 в клетках HFNs. HFNs выращивали в культуральной среде, содержащей различные антитела к Tay или контрольные антитела в конечной концентрации 30 мкг/мкл, в течение 20 дней. Результаты показаны на Фигурах 57А и 57В.

DA31 означает мышью моноклональное антитело, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 150-190 Tay (нумерация на основе последовательности 2N4R Tay, изображённой на Фигуре 61). Как показано на Фигуре 57А, антитело DA31, но не HT7 (антитело, специфическое к эпитопу в пределах аминокислот 159-163), снижало продуцирование А β ₄₀ в клетках HFNs. Как показано на Фигуре 57В, антитело DA31, но не HT7, снижало продуцирование А β ₄₂ в клетках HFNs.

Изучалось воздействие антител к Tay на продуцирование А β 40 и А β 42 во времени. HFNs выращивали в культуральной среде, содержащей различные антитела, описанные выше, в течение 5 дней (d5), 10 дней (d10), 15 дней (d15), или 20 дней (d20). Проверяли действие контрольного IgG, MC1, IPN002, PHF1 и DC39n1 (“N1 вставка”). DC39n1 означает мышью моноклональное антитело, которое связывает эпитоп в пределах 2N инсертов Tay (например, в пределах аминокислот 45-102 аминокислотной последовательности 2N4R Tay, изображённой на Фигуре 61). В конце периода выращивания количество А β 40 и А β 42 в культуральной среде определяли как описано выше. Результаты показаны на Фигурах 58А и 58В.

Как показано на Фигуре 58А, MC1 и IPN002, но не PHF1 и не DC39n1, снижали продуцирование А β ₄₀ в клетках HFNs. Как показано на Фигуре 58В, MC1 и IPN002, но не PHF1 и не DC39n1, снижали продуцирование А β ₄₂ в клетках HFNs.

ПРИМЕР 24: ВЛИЯНИЕ ГУМАНИЗИРОВАННОГО ВАРИАНТА IPN002 НА УРОВНИ А-БЕТА В CSF НЕЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ПРИМАТОВ

Изучалось влияние hu-IPN002, гуманизированного варианта IPN002, на уровни А β в CSF нечеловеческих приматов. Самцам яванского макака (*Macaca fascicularis*) медленно вводили единичную болячную инъекцию антитела hu-IPN002 с уровнем дозы 5 мг/кг или 20 мг/кг. Образцы спинномозговой жидкости (CSF) собирали в различные временные точки после инъекции. В образцах CSF количественно определяли А β 40 с помощью коммерчески доступного анализа ELISA. Результаты показаны на Фигуре 60. Представлены средние значения для всех образцов, собранных в конкретных временных точках (среднее ± стандартная ошибка среднего).

Как показано на Фигуре 60, единичная инъекция 20 мг/кг hu-IPN002 снижала уровень А β 40 в CSF примерно через 150 часов. Уровень А β 40 в CSF продолжал падать примерно до 350 часов.

Хотя настоящее изобретение описано на конкретных примерах, специалисты в данной области техники понимают, что можно внести различные изменения и можно заменить на эквиваленты не отступая от истинной сущности и в пределах объёма

изобретения. Кроме того, можно сделать множество модификаций, чтобы адаптировать конкретные ситуацию, материал, химическое соединение, способ, стадию или стадии способа к целям, сущности и объёму настоящего изобретения. Предполагается, что все такие модификации входят в объём прилагаемой Формулы изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Грисвold-Преннер, Ирэн
Стаглиано, Нэнси Е.
Дан, Ву
Хуссейн, Сами
Брайт, Джессика М

<120> СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ТАУПАТИИ

<130> MXI-603PCCPPC

<150> US 14/092,539
<151> 2013-11-27

<150> PCT/US13/55203
<151> 2013-08-15

<150> US 61/833,355
<151> 2013-06-10

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 1

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 2

Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 3

Phe Gln Gly Ser Leu Val Pro Trp Ala

1

5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 4

Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 5

Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Phe Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 6

Thr Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 7

Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 8

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 8

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 9

Phe Gln Gly Ser Leu Val Pro Trp Ala
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 10

Lys Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 11

Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 12

Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 13

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ala Val Asn Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Val Pro Trp Ala Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Glu Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Phe Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Ile Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Thr Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Ile Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 15

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Val Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Val Pro Trp Ala Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 16

<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 16

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Ile Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 17
gatttttga tgacccaaac tccgctctcc ctggcagtca atcttgaga tcaaggctcc 60
ctctcttgca gatcgagtca gactattta catagtaatg gaaataccta tttagaatgg 120
tatttgcaga aaccaggcca gtctccaaga ctcctgatct acaaagttc taaacgattt 180
tctgggtcc cagacaggtt cagtgccagt ggatcaggga cagattcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgacga tctggaaatt tattactgct ttcaaggttc acttggcct 300
tggcgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 18

<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 18
gaggtgcagt tggggaggc tggggaaagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaaactc 60
tccttgtcg cttctggatt cgcttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagacatga ggctggaggta ggtcgcaaca attagtagca gtggtagtgc cacctacttt 180
ccagacagtgc tgaagggcg actcaccatc tccagagaca atgacaagaa catcctatac 240
ctacaaatga gcagtctgag gtctgaggac acagccatgt actattgtac gattacctgg 300
gacggtgcta tggactactg gggtcgtgga atatcagtca ccgtctcctc a 351

<210> 19
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 19
gatgtttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaaggctcc 60
atctcttgca aatcttagtca gagcattgtc catacgatgc gaaacaccta tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgggtc acaaagtttc caatcgattt 180
tctgggtcc cagacagggtt cagttggcgtt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtggtt aggctgagga tctggaaact tattactgtt ttcaagggttc acttggcct 300
tggcggtcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 20
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 20
gaggttcattc tggggaggc tggggaggcc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaaactc 60
tccttgtcg cttctggatt cagtttcgtt aaatatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagacaaga ggctggaggta ggtcgcaacc attagtagta gtggtagtgc cacctactat 180
ccagacagtgc tgaagggccaa attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgttc aattagctgg 300
gacggtgcta tggactactg gggcaaggaa acctcagtca ccgtctcctc a 351

<210> 21
<211> 441
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys

210

215

220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

<210> 22

<211> 383

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 22

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

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

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

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
210 215 220

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
225 230 235 240

His Val Pro Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
245 250 255

Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
260 265 270

Lys Pro Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
275 280 285

Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
290 295 300

Val Pro Gly Gly Asn Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
305 310 315 320

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

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

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

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

<210> 23
<211> 352
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 23

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

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

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

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp

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

325

330

335

Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
340 345 350

<210> 24
<211> 412
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
165 170 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225 230 235 240

Pro Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
245 250 255

Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25

<211> 776

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys Val Val Gln Glu Gly Phe Leu Arg Glu Pro Gly Pro Pro Gly
130 135 140

Leu Ser His Gln Leu Met Ser Gly Met Pro Gly Ala Pro Leu Leu Pro
145 150 155 160

Glu Gly Pro Arg Glu Ala Thr Arg Gln Pro Ser Gly Thr Gly Pro Glu
165 170 175

Asp Thr Glu Gly Gly Arg His Ala Pro Glu Leu Leu Lys His Gln Leu
180 185 190

Leu Gly Asp Leu His Gln Glu Gly Pro Pro Leu Lys Gly Ala Gly Gly
195 200 205

Lys Glu Arg Pro Gly Ser Lys Glu Glu Val Asp Glu Asp Arg Asp Val
210 215 220

Asp Glu Ser Ser Pro Gln Asp Ser Pro Pro Ser Lys Ala Ser Pro Ala
225 230 235 240

Gln Asp Gly Arg Pro Pro Gln Thr Ala Ala Arg Glu Ala Thr Ser Ile

245 250 255

Pro Gly Phe Pro Ala Glu Gly Ala Ile Pro Leu Pro Val Asp Phe Leu
260 265 270

Ser Lys Val Ser Thr Glu Ile Pro Ala Ser Glu Pro Asp Gly Pro Ser
275 280 285

Val Gly Arg Ala Lys Gly Gln Asp Ala Pro Leu Glu Phe Thr Phe His
290 295 300

Val Glu Ile Thr Pro Asn Val Gln Lys Glu Gln Ala His Ser Glu Glu
305 310 315 320

His Leu Gly Arg Ala Ala Phe Pro Gly Ala Pro Gly Glu Gly Pro Glu
325 330 335

Ala Arg Gly Pro Ser Leu Gly Glu Asp Thr Lys Glu Ala Asp Leu Pro
340 345 350

Glu Pro Ser Glu Lys Gln Pro Ala Ala Ala Pro Arg Gly Lys Pro Val
355 360 365

Ser Arg Val Pro Gln Leu Lys Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp
370 375 380

Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Thr Ser Thr Arg Ser Ser
385 390 395 400

Ala Lys Thr Leu Lys Asn Arg Pro Cys Leu Ser Pro Lys His Pro Thr
405 410 415

Pro Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ile Gln Pro Ser Ser Pro Ala Val Cys
420 425 430

Pro Glu Pro Pro Ser Ser Pro Lys His Val Ser Ser Val Thr Ser Arg
435 440 445

Thr Gly Ser Ser Gly Ala Lys Glu Met Lys Leu Lys Gly Ala Asp Gly
450 455 460

Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys
465 470 475 480

Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro
485 490 495

Lys Thr Pro Pro Ser Ser Ala Thr Lys Gln Val Gln Arg Arg Pro Pro

500 505 510

Pro Ala Gly Pro Arg Ser Glu Arg Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp
515 520 525

Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg
530 535 540

Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys
545 550 555 560

Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser
565 570 575

Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys
580 585 590

Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
595 600 605

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
610 615 620

Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
625 630 635 640

Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys
645 650 655

Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gln Val
660 665 670

Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys
675 680 685

Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Asn Lys
690 695 700

Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys
705 710 715 720

Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly
725 730 735

Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile
740 745 750

Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser

755

760

765

Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
770 775

<210> 26
<211> 758
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys Val Val Gln Glu Gly Phe Leu Arg Glu Pro Gly Pro Pro Gly
130 135 140

Leu Ser His Gln Leu Met Ser Gly Met Pro Gly Ala Pro Leu Leu Pro
145 150 155 160

Glu Gly Pro Arg Glu Ala Thr Arg Gln Pro Ser Gly Thr Gly Pro Glu
165 170 175

Asp Thr Glu Gly Gly Arg His Ala Pro Glu Leu Leu Lys His Gln Leu
180 185 190

Leu Gly Asp Leu His Gln Glu Gly Pro Pro Leu Lys Gly Ala Gly Gly
195 200 205

Lys Glu Arg Pro Gly Ser Lys Glu Glu Val Asp Glu Asp Arg Asp Val
210 215 220

Asp Glu Ser Ser Pro Gln Asp Ser Pro Pro Ser Lys Ala Ser Pro Ala
225 230 235 240

Gln Asp Gly Arg Pro Pro Gln Thr Ala Ala Arg Glu Ala Thr Ser Ile
245 250 255

Pro Gly Phe Pro Ala Glu Gly Ala Ile Pro Leu Pro Val Asp Phe Leu
260 265 270

Ser Lys Val Ser Thr Glu Ile Pro Ala Ser Glu Pro Asp Gly Pro Ser
275 280 285

Val Gly Arg Ala Lys Gly Gln Asp Ala Pro Leu Glu Phe Thr Phe His
290 295 300

Val Glu Ile Thr Pro Asn Val Gln Lys Glu Gln Ala His Ser Glu Glu
305 310 315 320

His Leu Gly Arg Ala Ala Phe Pro Gly Ala Pro Gly Glu Gly Pro Glu
325 330 335

Ala Arg Gly Pro Ser Leu Gly Glu Asp Thr Lys Glu Ala Asp Leu Pro
340 345 350

Glu Pro Ser Glu Lys Gln Pro Ala Ala Ala Pro Arg Gly Lys Pro Val
355 360 365

Ser Arg Val Pro Gln Leu Lys Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp
370 375 380

Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Thr Ser Thr Arg Ser Ser
385 390 395 400

Ala Lys Thr Leu Lys Asn Arg Pro Cys Leu Ser Pro Lys His Pro Thr
405 410 415

Pro Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ile Gln Pro Ser Ser Pro Ala Val Cys
420 425 430

Pro Glu Pro Pro Ser Ser Pro Lys His Val Ser Ser Val Thr Ser Arg
435 440 445

Thr Gly Ser Ser Gly Ala Lys Glu Met Lys Leu Lys Gly Ala Asp Gly
450 455 460

Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys
465 470 475 480

Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro
485 490 495

Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser
500 505 510

Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
515 520 525

Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala
530 535 540

Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu
545 550 555 560

Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys
565 570 575

Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Lys Val
580 585 590

Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys
595 600 605

Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Ser Val Gln
610 615 620

Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly
625 630 635 640

Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gln Val Glu Val
645 650 655

Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly
660 665 670

Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Asn Lys Lys Ile
675 680 685

Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp
690 695 700

His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr
705 710 715 720

Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met
725 730 735

Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser
740 745 750

Leu Ala Lys Gln Gly Leu
755

<210> 27
<211> 352
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 27

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

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

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

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro

145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
210 215 220

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
225 230 235 240

His Lys Pro Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
245 250 255

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
260 265 270

His Val Pro Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
275 280 285

Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
290 295 300

Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
305 310 315 320

Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
325 330 335

Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
340 345 350

<210> 28
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 28
gaggttcatc tgggtggagtc tgggggagcc ttagtgaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cagttcagt aaatatggca tgtcttggtt tcgccaggcc 120

ccaggcaagg gcctggagtg ggtcgcaacc attagtagta gtgggagtcg cacctactat 180
ccagacagtg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgttc aattagctgg 300
gacggtgcta tggactactg gggtaaggg acctcagtca ccgtctcctc a 351

<210> 29
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 29
gaggttcatc tgggtggagtc tgggggagcc ttagtgaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cagttcagt aaatatggca tgtcttgggt tcgccaggcc 120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtcgcaacc attagtagta gtgggagtcg cacctactat 180
ccagacagtg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acagccatgt attactgttc aattagctgg 300
gacggtgcta tggactactg gggtaaggg accaccgtca ccgtctcctc a 351

<210> 30
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 30
gaggttcagc tgggtggagtc tgggggagcc ttagtgaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cagttcagt aaatatggca tgtcttgggt tcgccaggcc 120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtcgcaacc attagtagta gtgggagtcg cacctactat 180
ccagacagtg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acagccatgt attactgttc aattagctgg 300
gacggtgcta tggactactg gggtaaggg accaccgtca ccgtctcctc a 351

<210> 31
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 31
gaggttcagc tgggtggagtc tgggggagcc ttagtgaagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cagttcagt aaatatggca tgtcttggt tcgccaggcc 120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtcgcaacc attagtagta gtgggagtcg cacctactat 180
ccagacagtg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acagccatgt attactgtgc cattagctgg 300
gacggtgcta tggactactg gggtcaaggg accaccgtca ccgtctcctc a 351

<210> 32
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 32
gattttga tgacccaaag cccactctcc ctgcctgtca cccttgaca gccccctcc 60
atctttgca aatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccacag ctccctggtct acaaagtttc caatcgattt 180
tctgggtcc cagacagatt cagttgcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtggact tattactgct ttcaaggctc acttggcct 300
tggcgttcg gtggaggcac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 33
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 33
gattttgtga tgacccaaag cccactctcc ctgcctgtca cccttgaca gccccctcc 60
atctttgca aatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccacag ctccctggtct acaaagtttc caatcgattt 180
tctgggtcc cagacagatt cagttgcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtggact tattactgct ttcaaggctc acttggcct 300
tggcgttcg gtggaggcac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 34
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 34

gatgttgtga	tgacccaaag	cccactctcc	ctgcctgtca	cccttggaca	gccccctcc	60
atctcttgca	aatctagtca	gaggcattgt	catagtaatg	gaaacaccta	tttagaatgg	120
tacctgcaga	aaccaggcca	gtctccacag	ctcctggtct	acaaagttc	caatcgattt	180
tctgggtcc	cagacagatt	cagtggcagt	ggatcaggga	cagatttcac	actcaagatc	240
agcagagtgg	aggctgagga	tgtggagtg	tattactgct	ttcaaggctc	acttggcct	300
tggcgttcg	gtggaggcac	caaggtggaa	atcaaaa			336

<210> 35
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic nucleic acid sequence

<400> 35	gatgttgtga	tgacccaaag	cccactctcc	ctgcctgtca	cccttggaca	gccccctcc	60
	atctcttgca	aatctagtca	gaggcattgt	catagtaatg	gaaacaccta	tttagaatgg	120
	tacctgcaga	aaccaggcca	gtctccacag	ctcctgatct	acaaagttc	caatcgattt	180
	tctgggtcc	cagacagatt	cagtggcagt	ggatcaggga	cagatttcac	actcaagatc	240
	agcagagtgg	aggctgagga	tgtggagtg	tattactgct	ttcaaggctc	acttggcct	300
	tggcgttcg	gtggaggcac	caaggtggaa	atcaaaa			336

<210> 36
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 36

Glu	Val	His	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10			15			

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Ser	Lys	Tyr
				20				25				30			

Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35				40					45					

Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val
			50				55			60					

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70					75			80			

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Ile Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 37

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Ile Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Ile Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Ile Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 40

Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Val Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Val Pro Trp Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 41

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Val Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Val Pro Trp Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 42
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 42

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Val Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Val Pro Trp Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 43
<211> 112
<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 43

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Val Pro Trp Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 44

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 44

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

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

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

Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr
50 55 60

Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp
65 70 75 80

Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg
85 90 95

Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile
100 105 110

Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu
115 120 125

Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro
130 135 140

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
145 150 155 160

Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg
165 170

<210> 45
<211> 175
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 45

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

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

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

Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr
50 55 60

Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp
65 70 75 80

Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg
85 90 95

Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile
100 105 110

Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu

115

120

125

Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro
130 135 140

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
145 150 155 160

Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175

<210> 46

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 46

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

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

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

Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr
50 55 60

Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp
65 70 75 80

Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg
85 90 95

Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile
100 105 110

Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu
115 120 125

Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro
130 135 140

Gly Thr Pro Gly Ser Arg
145 150

<210> 47
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 47

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

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

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

Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr
50 55 60

Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp
65 70 75 80

Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg
85 90 95

Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile
100 105 110

Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys
115 120

<210> 48
<211> 67
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 48

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

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

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

Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr
50 55 60

Gln Ala Arg
65

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 49

Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys
1 5 10

<210> 50
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 50

Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr
1 5 10 15

Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys
20 25 30

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 51

Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys
1 5 10

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> The amino acid at this position is phosphorylated

<400> 52

Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys
1 5 10

<210> 53
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 53

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

Thr Tyr

<210> 54
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X at this position is L or V

<400> 54

Asp Val Xaa Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 55
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)
<223> X at this position is V or I

<400> 55

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Xaa Tyr
1 5 10 15

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> X at this position is T or V

<400> 56

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Xaa Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 57

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 58

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 59
<211> 4
<212> PRT

<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic amino acid sequence
<400> 59

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 60
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 60

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 61

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 62

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 63

Gly Ser Gly Gly

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 64

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 65

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 66

His His His His His
1 5

<210> 67
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 67

His His His His His His
1 5

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 68

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 69

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 70

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 71

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 72

Arg Tyr Ile Arg Ser
1 5

<210> 73
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 73

Phe His His Thr
1

<210> 74
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 74

Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg
1 5 10 15

Ala

<210> 75
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 75

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 76
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 76

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 77
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 77

Cys Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys
1 5 10 15

Thr Glu Glu Tyr
20

<210> 78
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 78

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr Cys
20

<210> 79
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 79

Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser
1 5 10 15

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 80

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

Tyr

<210> 81
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 81

Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys
1 5 10 15

<210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 82

Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp
1 5

<210> 83
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic amino acid sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X at this position is an H or Q

<400> 83

Glu Val Xaa Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
20 25 30

<210> 84
<211> 14
<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic amino acid sequence

<400> 84

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 85

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic amino acid sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> X at this position is an S or N

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> X at this position is an S or L

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> X at this position is a K or R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> X at this position is a S or A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> X at this position is a S or A

<400> 85

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Xaa Ile
20 25 30

<210> 86

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic amino acid sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X at this position is an S or T

<400> 86

Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

Формула изобретения

1. Способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту: гуманизированного антитела к Тау-полипептиду, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминоконцевого (N-концевого) участка Тау-полипептида; при этом указанное введение влечёт за собой изменение количества Аβ40 и/или Аβ42 в CSF или секреции Аβ40 и/или Аβ42 нейронами субъекта.
2. Способ по п. 1, в котором эпитоп представляет собой линейный эпитоп.
3. Способ по п.п. 1 или 2, в котором эпитоп находится в пределах аминокислот 1-25 или 15-44 Тау-полипептида.
4. Способ по п.п. 1 или 2, в котором эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида.
5. Способ лечения таупатии у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей:
 - a) антитело, содержащее каркасную область гуманизированной лёгкой цепи или каркасную область гуманизированной тяжёлой цепи, которое конкурирует за связывание с эпитопом на N-концевом участке Тау-полипептида, с антителом, которое содержит:
 - i) участки, определяющие комплементарность (CDR) лёгкой цепи антитела, показанные на Фигуре 1В; и гипервариабельные участки (CDR) тяжёлой цепи антитела, показанные на Фигуре 1А; или
 - ii) CDR лёгкой цепи антитела, показанные на Фигуре 2В; и CDR тяжёлой цепи антитела, показанные на Фигуре 2А; и
 - b) фармацевтически приемлемый эксципиент, пригодный для введения человеку; при этом указанное введение влечёт за собой изменение количества Аβ40 и/или Аβ42 в CSF или секреции Аβ40 и/или Аβ42 нейронами субъекта.
6. Способ по п. 5, в котором антитело содержит:
 - (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:7;
 - (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:8;

- (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:9;
- (iv) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:10;
- (v) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:11; and
- (vi) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:12.

7. Способ по п. 5, в котором антитело инкапсулировано в липосому.

8. Способ по п. 5, в котором антитело находится в составе с агентом, который способствует переносу через гематоэнцефалический барьер.

9. Способ по п. 5, в котором антитело связано, непосредственно или через линкер, с молекулой-носителем, пептидом или белком, которые способствуют переносу через гематоэнцефалический барьер.

10. Способ по п.п. 1 или 5, в котором антитело представляет собой Fv, scFv, Fab, F(ab')2 или Fab'.

11. Способ по п.п. 1 или 5, включающий также введение по меньшей мере одного дополнительного агента, который лечит таупатию.

12. Способ по п.п. 1 или 5, в котором указанное введение является внутривенным введением.

13. Способ по п.п. 1 или 5, в котором указанное введение является интракальвальным введением.

Последовательности тяжёлой цепи гибридомного антитела IPN001

1 E V Q L V E S G E D L V K P G G S L K L
 GAGGTGCA GT TGGTGGAGTC TG GGGGAAGAC TT AGTGAAGC CT GGAGGGTC CCTGAAACTC
 2
 61 S C V A S G F A F S S Y G M S W V R Q T
 TCCTGTGTCG CTTCTGGATT CGCTTTCAGT AGCTATGGCA TGTCT TGGGT TCGCCAGACT
 121 P D M R L E W V A T I S S S G S R T Y F
 CCAGACATGA CGCTGGAGTG GGTGGCAACA ATTAGTAGCA GTGGTAGTCG CACCTACTTT
 181 P D S V K G R L T I S R D N D K N I L Y
 CCAGACAGTG TGAAGGGCG ACTCACCATC TCCAGAGACA ATGACAAGAA CATCCTATAAC
 241 L Q M S S L R S E D T A M Y Y C T I T W
 CTACAAATGA CGAGTCTGAG GTCTGAGGAC ACAGCCATGT ACTATTGTAC GATTACCTGG
 301 D G A M D Y W G R G I S V T V S S (SEQ ID NO:14)
GACGGTGCTA TGGACTACTG CGGTGCTGGA ATATCA GTCA CCGTCTCCTC A (SEQ ID NO:18)

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
 CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

ФИГУРА 1А

Последовательности лёгкой цепи гибридомного антитела IPN001

1	D V L M T Q T P L S L A V N L G D Q A S GATGTTTGA TGACCCAAAC TCCGCTCTCC CTGGCAGTCA ATCTTGGAGA TCAAGCCTCC
61	L S C R S S Q T I L H S N G N T Y L E W CTCTCTTGCA GATCGAGTC GACTATTTA CATAGTAATG GAAATACTA TTTAGAATGG
121	Y L Q K P G Q S P R L L I Y K V S K R F TATTTGCAGA AACCAAGGCCA GTCTCCAAGA CTCCTGATCT ACAAAAGTTTC TAAACGATT
181	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I TCTGGGGTCC CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTCAC ACTCAAGATC
241	S R V E A D D L G I Y Y C F Q G S L V P AGCAGAGTGG AGGCTGACGA TCTGGGAATT TATTACTGCT TTCAAGGTTC ACTTGTTCC
301	W A F G G G T K L E I K (SEQ ID NO:13) TGGCGTTCG GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAA (SEQ ID NO:17)

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
 CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

ФИГУРА 1В

Последовательности лёгкой цепи гибридомного антитела IPN002

```

1      E V H L V E S G G A L V K P G G S L K L
      GAGGTTCATC TGGTGGAGTC TGGGGGAGCC TTAGTGAAGC CTGGAGGGTC CCTGAAACTC

61     S C A A S G F S F S K Y G M S W V R Q T
      TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CAGTTCACT AAATATGGCA TGTCTTGGGT TCGCCAGACT

121    P D K R L E W V A T I S S S G S R T Y Y
      CCAGACAAGA GGCTGGAGTG GGTGCAACC ATTAGTAGTA GTGGGAGTCG CACCTACTAT

181    P D S V K G Q F T I S R D N A K N T L Y
      CCAGACAGTG TGAAGGGCCA ATTCAACCATC TCCAGAGACA ATGCCAAGAA CACCCTGTAC

241    L Q M S S L K S E D T A M Y Y C S I S W
      CTGCAAATGA GCAGTCTGAA GTCTGAGGAC ACAGCCATGT ATTACTGTTC AATTAGCTGG

301    D G A M D Y W G Q G T S V T V S S (SEQ ID NO:16)
      GACGGTGCTA TGGACTACTG GGGTCAAGGG ACCTCACTCA CCGTCTCCTC A (SEQ ID NO:20)

```

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
 CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

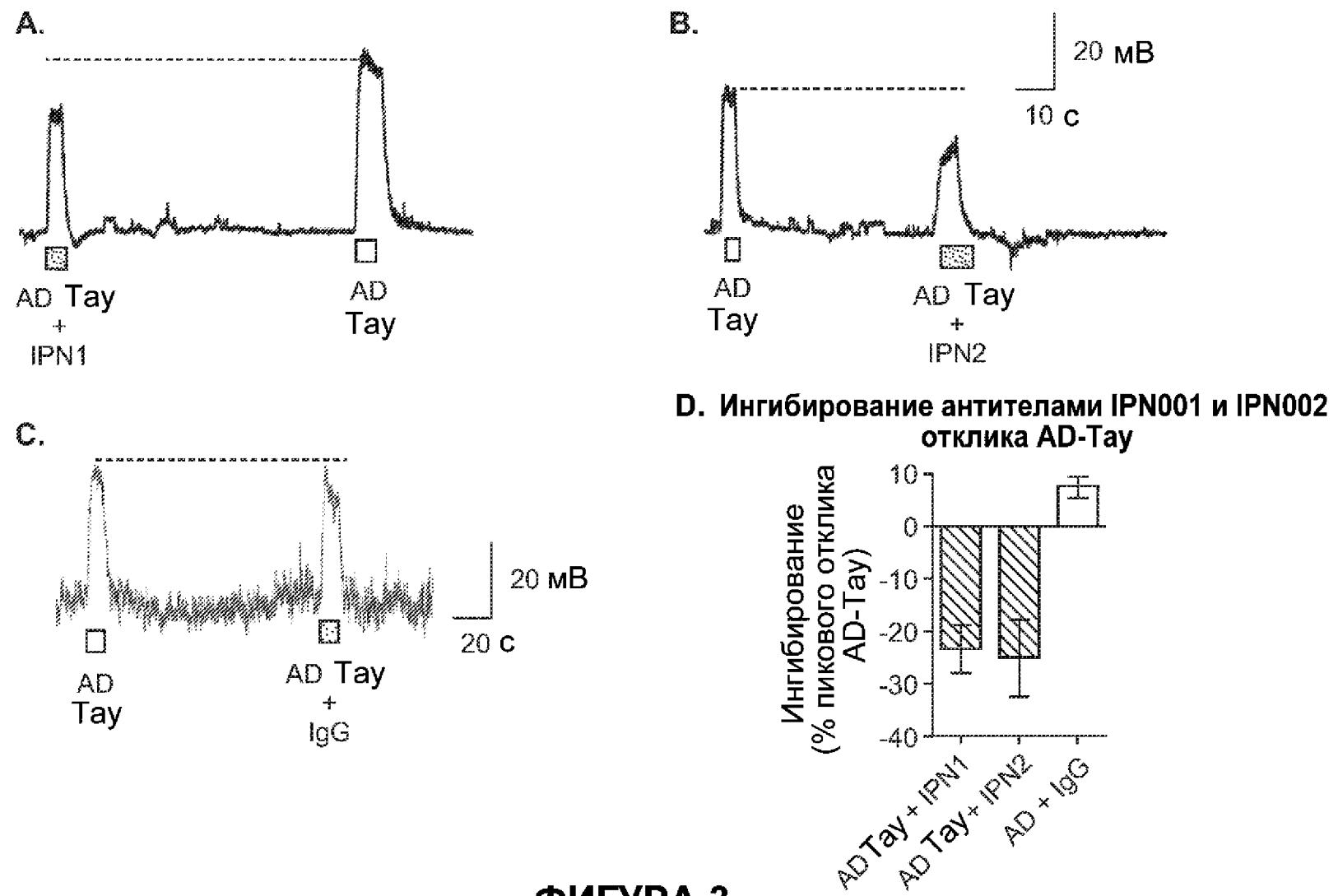
ФИГУРА 2А

Последовательности тяжёлой цепи гибридомного антитела IPN002

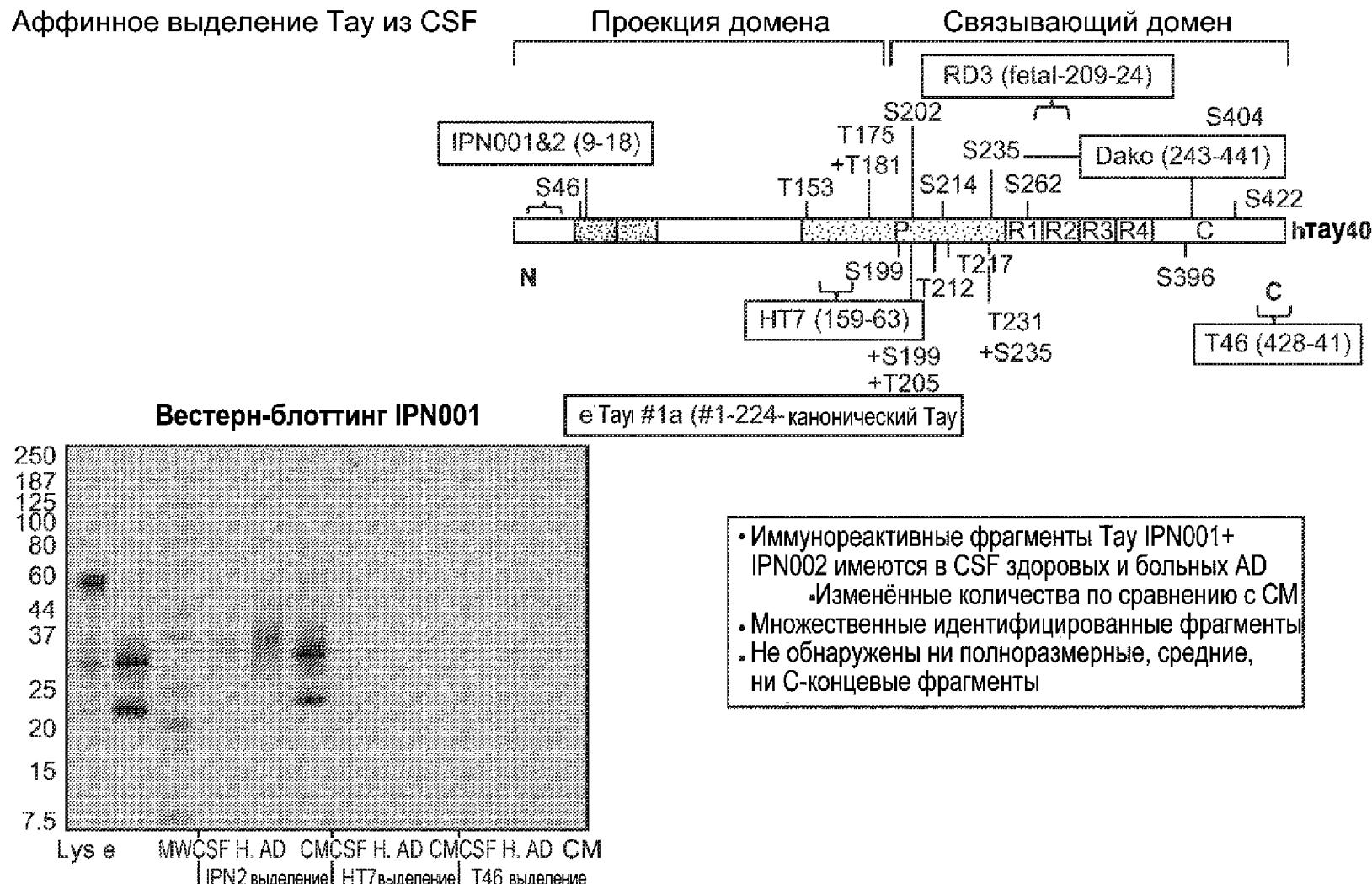
1	D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S GATGTTTGA TGACCCAAAC TCCACTCTCC CTGCCTGTCA GTCTGGAGA TCAAGCCTCC
61	I S C K S S Q S I V H S N G N T Y L E W ATCTCTTGCA AATCTAGTCA GAGCATTGTA CATACTAATG GAAACACCTA TTTAGAACATGG
121	Y L Q K P G Q S P K L L V Y K V S N R F TACCTGCAGA AACCAAGGCCA GTCTCCAAAG CTCCCTGGTCT ACAAGTTTC CAATCGATT
181	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I TCT GGGGTCC CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTCAC ACTCAAGATC
241	S R V E A E D L G T Y Y C F Q G S L V P AGCAGAGCTGG AGGCTGAGGA TCTGGGAAC TATTACTGCT TTCAAGGTTC ACTTGTTCC
301	W A F G G G T K L E I K (SEQ ID NO:15) TGGCGTTCG GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAA (SEQ ID NO:19)

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
 CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

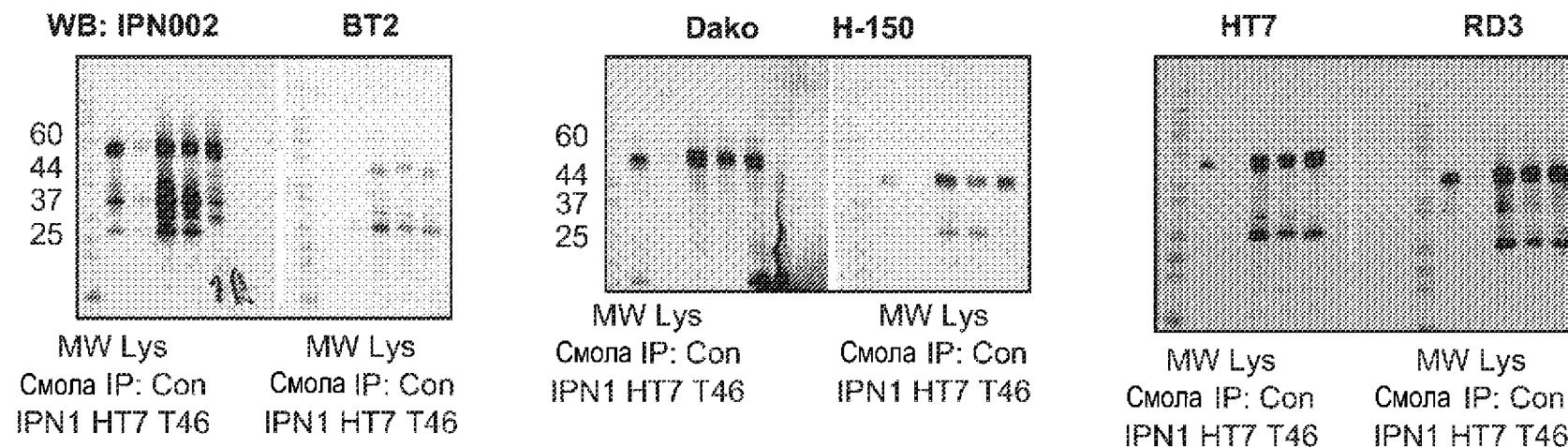
ФИГУРА 2В



ФИГУРА 3



ФИГУРА 4А

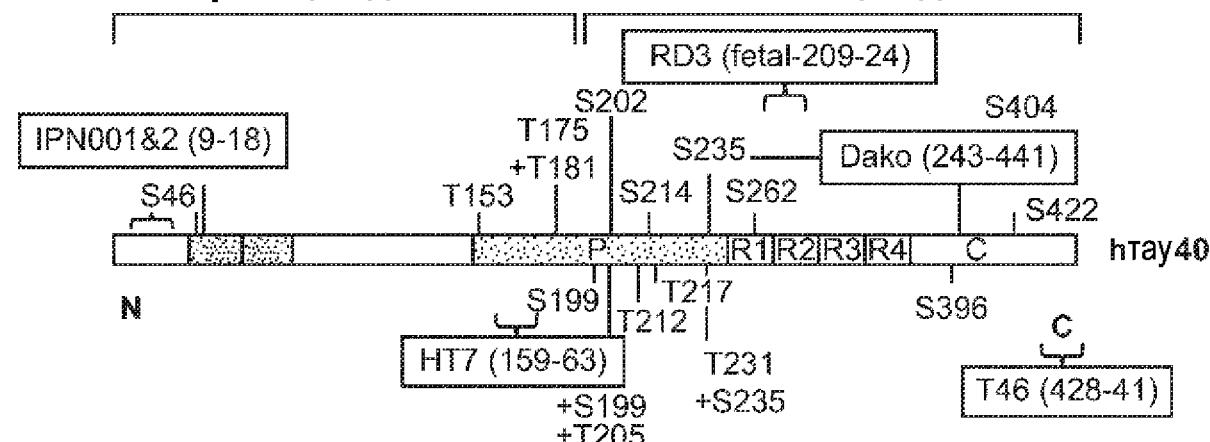


Фигура 4А (продолжение)

Аффинное выделение Tau из CSF

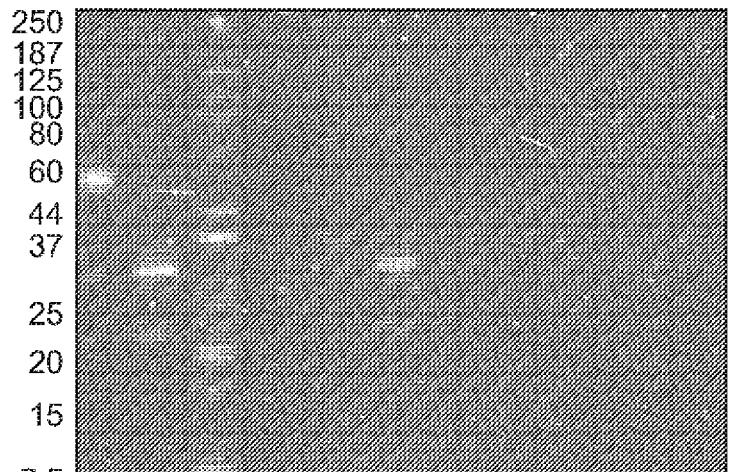
Проекция домена

Связывающий домен



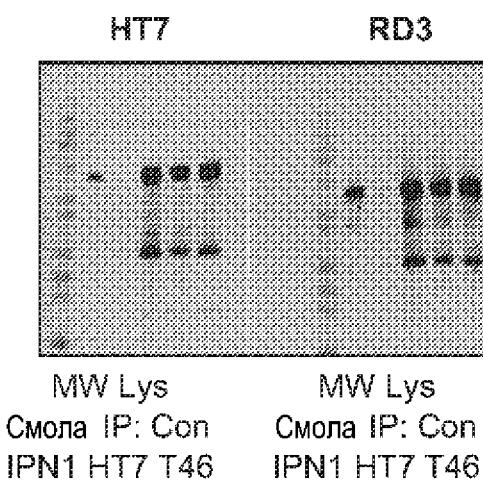
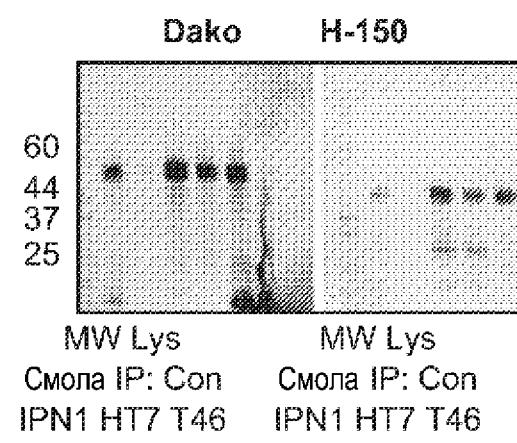
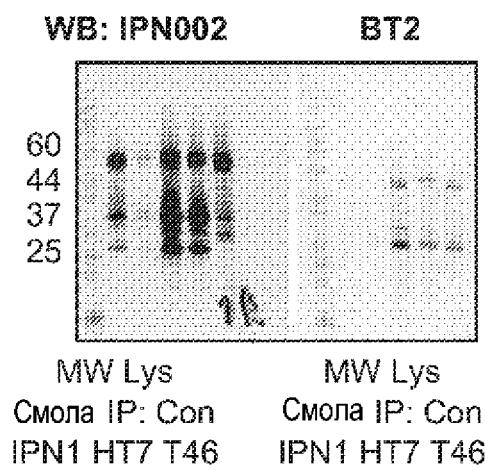
Вестерн-блоттинг H1-150

eTau #1a (#1-224-канонический Tau)

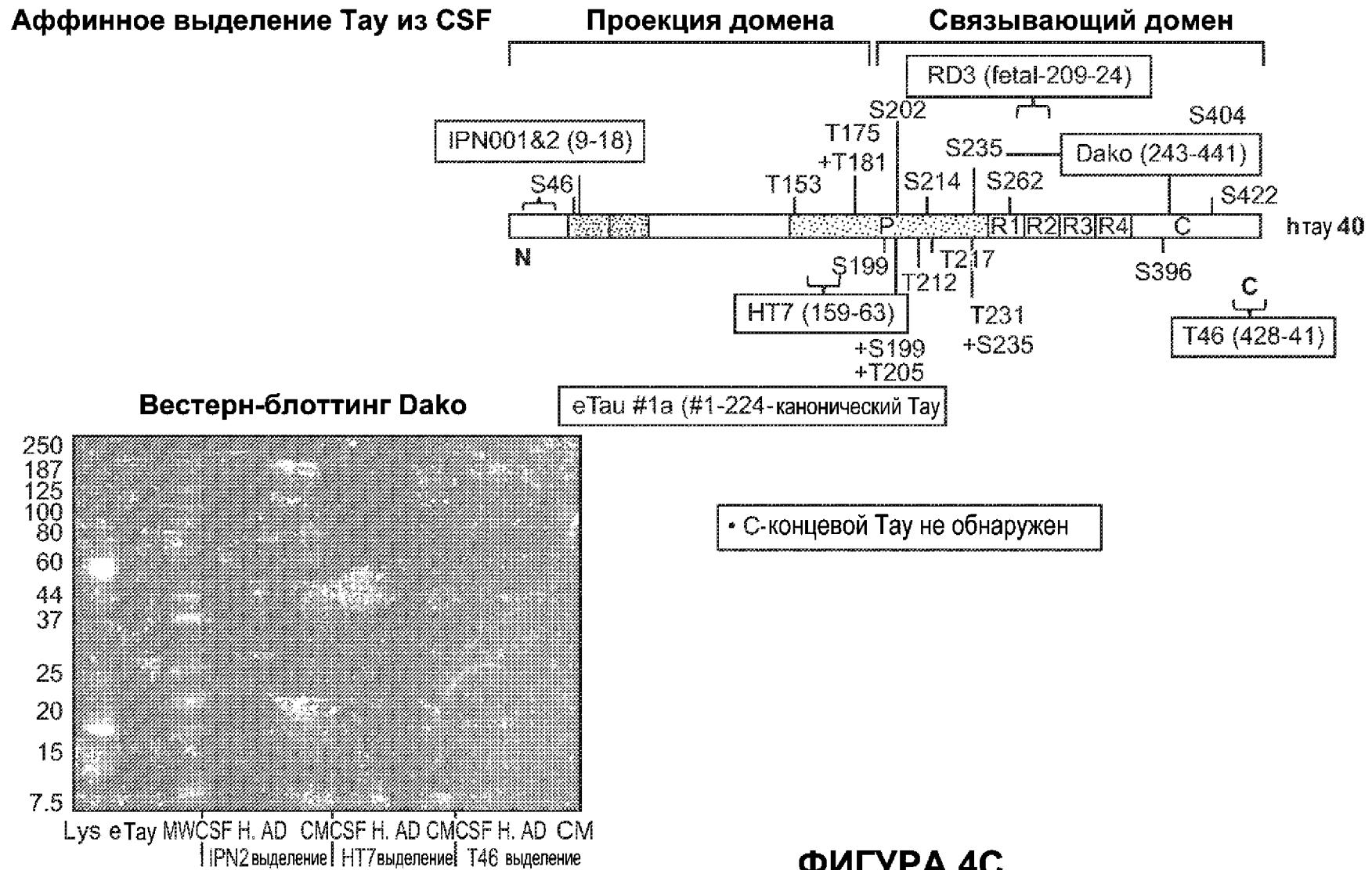


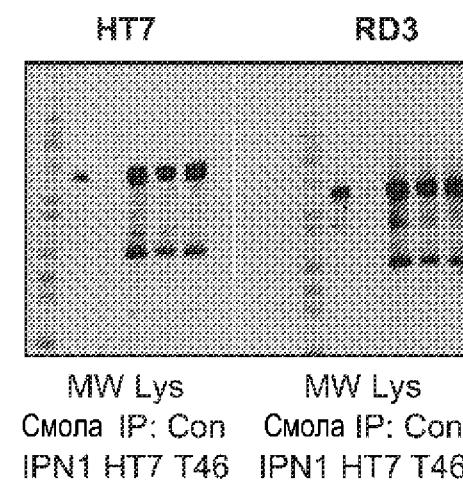
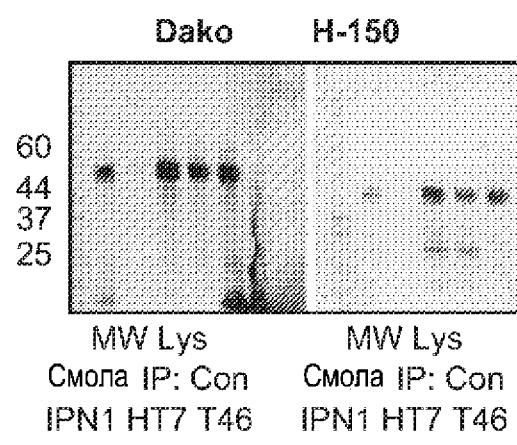
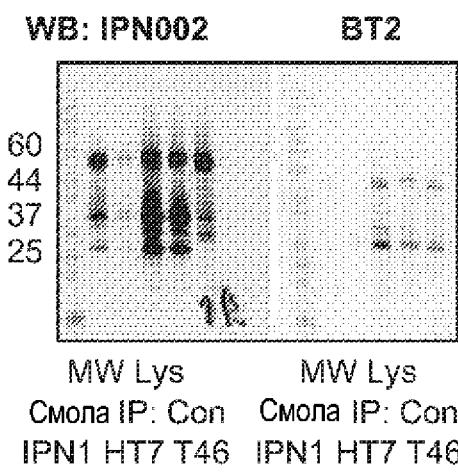
- Дополнительная кросс-реактивность N-концов антитела к Tau подтверждает наличие Tau с N-концами в CSF.
- Средние участки (захваченные N-концы или C-концы) Tau не обнаружены

ФИГУРА 4В



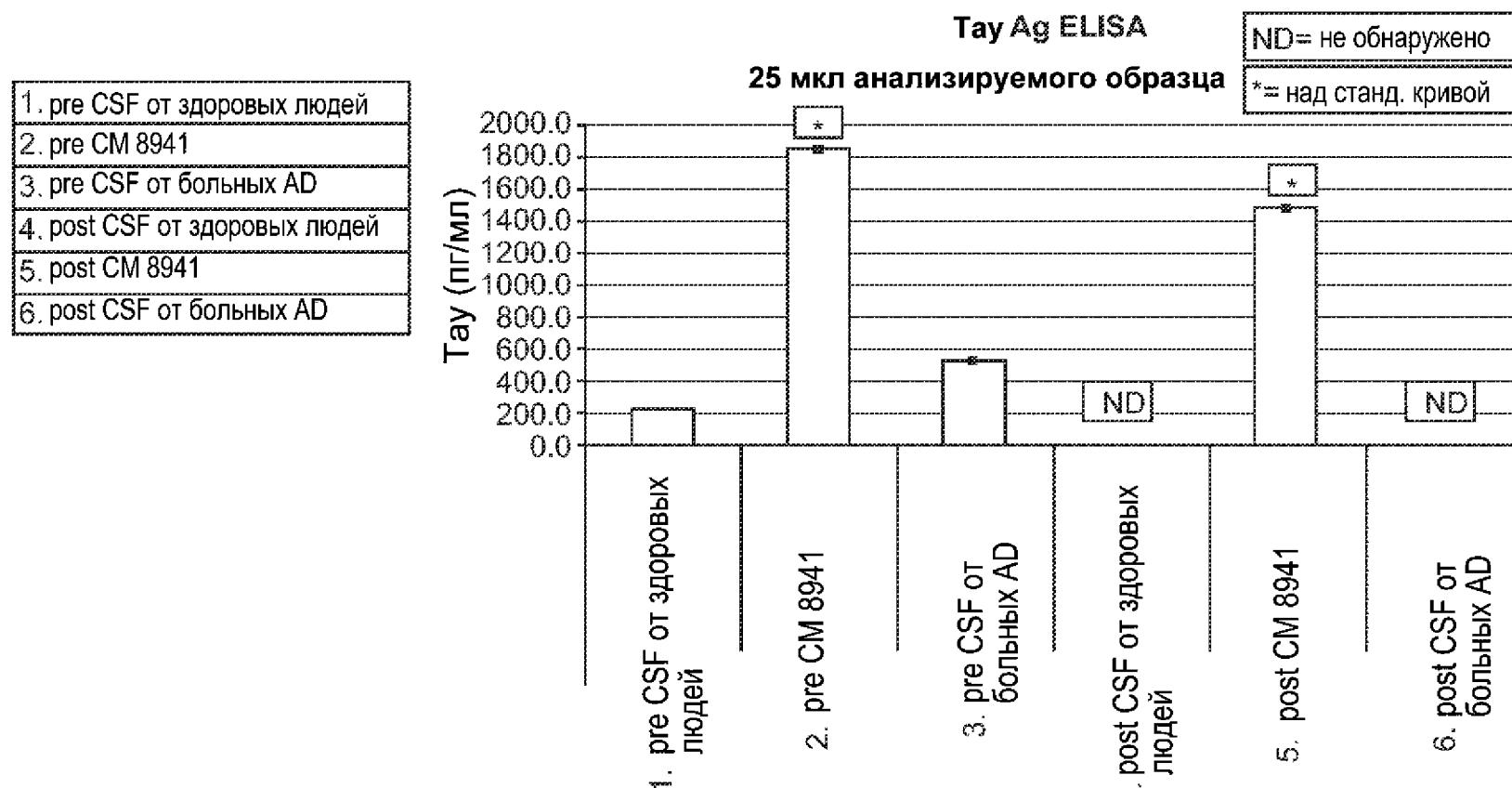
ФИГУРА 4В (продолжение)

**ФИГУРА 4С**



ФИГУРА 4С (продолжение)

Количественный анализ CSF и СМ до и после аффинного выделения Tau



ФИГУРА 5

Изоформы Tau человека

Изоформа 2	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGLTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG	60
Изоформа 3	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGLTDAGLK-----	44
Изоформа 4	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGLTDAGLK-----	44
Изоформа 5	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGLTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG	60
Изоформа 6	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGLTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG	60
Изоформа 1	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGLTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG	60
Фетальный	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGLTDAGLK-----	

Изоформа 2	SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPRTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG	120
Изоформа 3	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	62
Изоформа 4	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	62
Изоформа 5	SETSDAKSTP-----TAAEAEAGIGDTPSLEDEAAG	91
Изоформа 6	SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPRTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG	120
Изоформа 1	SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPRTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG	120
Фетальный	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	

Изоформа 2	HVTQ-----	124
Изоформа 3	HVTQ-----	66
Изоформа 4	HVTQ-----	66
Изоформа 5	HVTQ-----	95
Изоформа 6	HVTQEPESGKVVQEGLREPGLSHQLMSGMPGAPLLPEGPREATRQPSGTGPEDTEG	180
Изоформа 1	HVTQEPESGKVVQEGLREPGLSHQLMSGMPGAPLLPEGPREATRQPSGTGPEDTEG	180
Фетальный	HVTQ-----	

ФИГУРА 6А

Изоформа 2		
Изоформа 3		
Изоформа 4		
Изоформа 5		
Изоформа 6	GRHAPELLKHQLLGDLHQEGPPLKGAGGKERPGSKEEVDEDRDVDESSPQDSPPSKASPA	240
Изоформа 1	GRHAPELLKHQLLGDLHQEGPPLKGAGGKERPGSKEEVDEDRDVDESSPQDSPPSKASPA	240
Фетальный		
Изоформа 2		
Изоформа 3		
Изоформа 4		
Изоформа 5		
Изоформа 6	QDGRPPQTAAREATSIPGFPAEGAIPLPVDFLSKVSTEIPASEPDGPSVGRAKGQDAPLE	300
Изоформа 1	QDGRPPQTAAREATSIPGFPAEGAIPLPVDFLSKVSTEIPASEPDGPSVGRAKGQDAPLE	300
Фетальный		
Изоформа 2		
Изоформа 3		
Изоформа 4		
Изоформа 5		
Изоформа 6	FTFHVEITPNVQKEQAHSEEHLGRAAFTPGLGEPEARGPSLGEDTKEADLPEPSEKQPA	360
Изоформа 1	FTFHVEITPNVQKEQAHSEEHLGRAAFTPGLGEPEARGPSLGEDTKEADLPEPSEKQPA	360
Фетальный		
Изоформа 2	-----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK-----	143
Изоформа 3	-----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK-----	85
Изоформа 4	-----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK-----	85
Изоформа 5	-----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK-----	114
Изоформа 6	AAPRGKPVSRVPQLKARMVSKSKDGTGSDDKKAKTSTRSSAKTLKNRCPCLSPKHPTPGSS	420
Изоформа 1	AAPRGKPVSRVPQLKARMVSKSKDGTGSDDKKAKTSTRSSAKTLKNRCPCLSPKHPTPGSS	420
Фетальный	-----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK-----	

ФИГУРА 6В

Изоформа 2	-----	GADGKTKIATPRGAAPPQK	163
Изоформа 3	-----	GADGKTKIATPRGAAPPQK	105
Изоформа 4	-----	GADGKTKIATPRGAAPPQK	105
Изоформа 5	-----	GADGKTKIATPRGAAPPQK	134
Изоформа 6	DPLIQPSSPAVCPEPPSSPKHVSSVTSRTGSSAKEMKLKGADGKTKIATPRGAAPPQK	480	
Изоформа 1	DPLIQPSSPAVCPEPPSSPKHVSSVTSRTGSSAKEMKLKGADGKTKIATPRGAAPPQK	480	
Фетальный	-----	GADGKTKIATPRGAAPPQK	

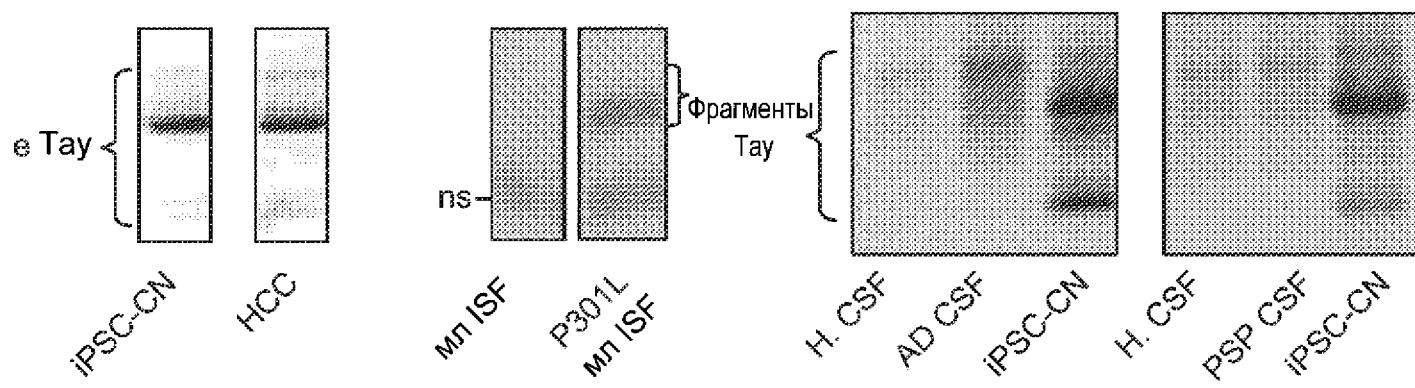
Изоформа 2	GQANATRIPAKTPPAPKTPPSS-----	GEPPKGDRSGYSSPGSPGT	205
Изоформа 3	GQANATRIPAKTPPAPKTPPSS-----	GEPPKGDRSGYSSPGSPGT	147
Изоформа 4	GQANATRIPAKTPPAPKTPPSS-----	GEPPKGDRSGYSSPGSPGT	147
Изоформа 5	GQANATRIPAKTPPAPKTPPSS-----	GEPPKGDRSGYSSPGSPGT	176
Изоформа 6	GQANATRIPAKTPPAPKTPPSSATKVQQRPPPAGPRSERGEPPKGDRSGYSSPGSPGT	540	
Изоформа 1	GQANATRIPAKTPPAPKTPPSS-----	GEPPKGDRSGYSSPGSPGT	522
Фетальный	GQANATRIPAKTPPAPKTPPSS-----	GEPPKGDRSGYSSPGSPGT	
	*****	*****	
Изоформа 2	PGSRSRTPSLPTPPTREPKKAVVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTEN	265	
Изоформа 3	PGSRSRTPSLPTPPTREPKKAVVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTEN	207	
Изоформа 4	PGSRSRTPSLPTPPTREPKKAVVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTEN	207	
Изоформа 5	PGSRSRTPSLPTPPTREPKKAVVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTEN	236	
Изоформа 6	PGSRSRTPSLPTPPTREPKKAVVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTEN	600	
Изоформа 1	PGSRSRTPSLPTPPTREPKKAVVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTEN	582	
Фетальный	PGSRSRTPSLPTPPTREPKKAVVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTEN		
	*****	*****	

ФИГУРА 6С

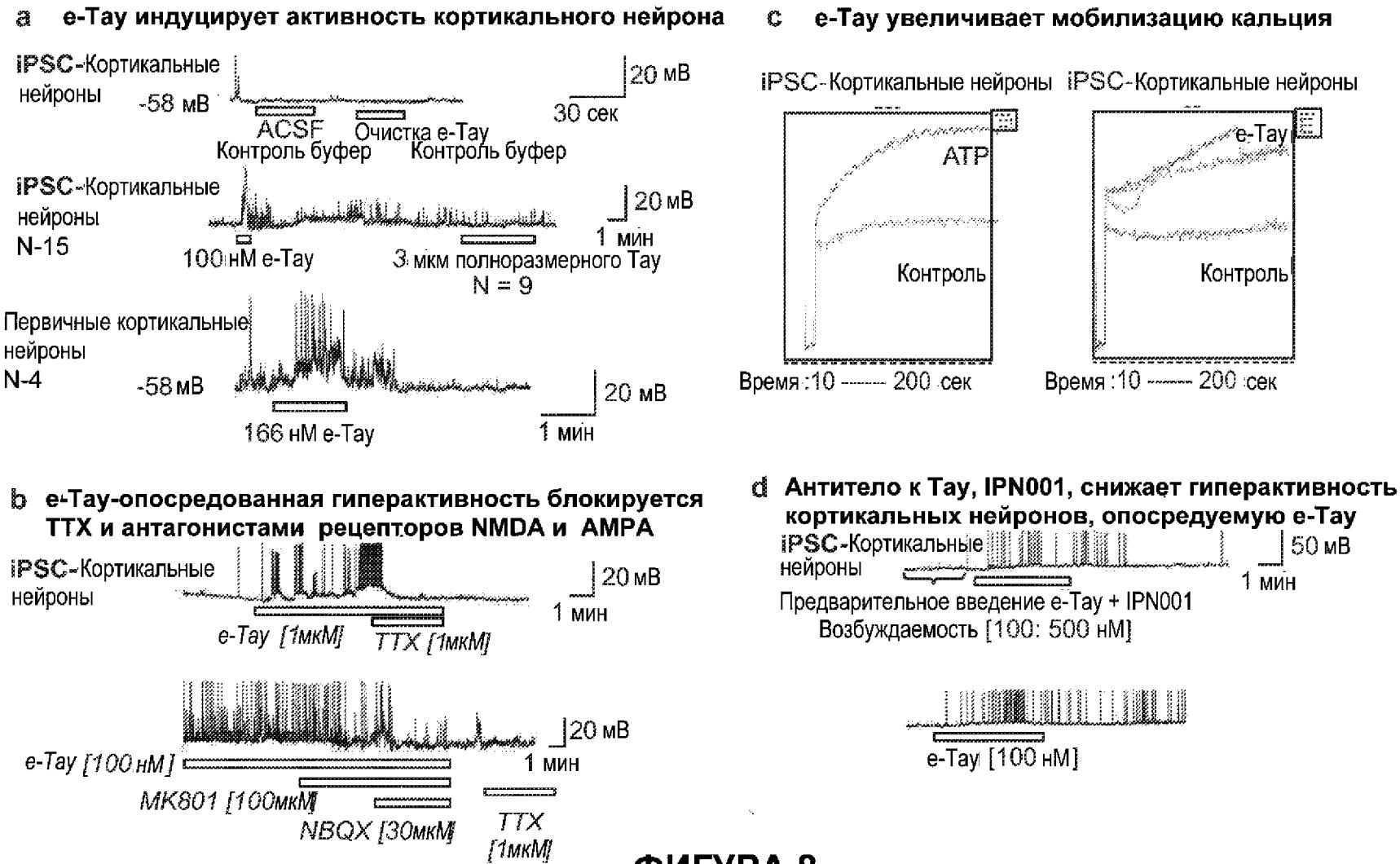
Изоформа 2	LKHQPGGGKVQIINKLDSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSL	325
Изоформа 3	LKHQPGGGKVQIINKLDSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSL	267
Изоформа 4	LKHQPGGGK-----VQIVYKPVDSLKVTSKCGSL	236
Изоформа 5	LKHQPGGGKVQIINKLDSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSL	296
Изоформа 6	LKHQPGGGKVQIINKLDSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSL	660
Изоформа 1	LKHQPGGGKVQIINKLDSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSL	642
Фетальный	LKHQPGGGK-----VQIVYKPVDSLKVTSKCGSL *****	*****
Изоформа 2	GNIHHKPQGGQVEVKSEKLDLKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK	385
Изоформа 3	GNIHHKPQGGQVEVKSEKLDLKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK	327
Изоформа 4	GNIHHKPQGGQVEVKSEKLDLKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK	296
Изоформа 5	GNIHHKPQGGQVEVKSEKLDLKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK	356
Изоформа 6	GNIHHKPQGGQVEVKSEKLDLKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK	720
Изоформа 1	GNIHHKPQGGQVEVKSEKLDLKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK	702
Фетальный	GNIHHKPQGGQVEVKSEKLDLKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK *****	*****
Изоформа 2	TDHGAEIVYKSPVVGDTSPRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL	441 (SEQ ID NO:21)
Изоформа 3	TDHGAEIVYKSPVVGDTSPRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL	383 (SEQ ID NO:22)
Изоформа 4	TDHGAEIVYKSPVVGDTSPRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL	352 (SEQ ID NO:23)
Изоформа 5	TDHGAEIVYKSPVVGDTSPRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL	412 (SEQ ID NO:24)
Изоформа 6	TDHGAEIVYKSPVVGDTSPRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL	776 (SEQ ID NO:25)
Изоформа 1	TDHGAEIVYKSPVVGDTSPRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL	758 (SEQ ID NO:26)
Фетальный	TDHGAEIVYKSPVVGDTSPRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL	(SEQ ID NO:27) *****

ФИГУРА 6D

Фрагменты Tay в кондиционированной среде, образцах P301L мышного ISF и человеческого CSF



ФИГУРА 7



ФИГУРА 8

IPN002 VH Вариант 1

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAGGTTCATCTGGTGGAGTCTGGGGAGCCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCAGTAAATATGGCA									
E	V	H	L	V	E	S	G	G	A
						L	V	K	P
							G	G	S
							L	R	L
							S	C	A
							A	A	S
							G	F	S
							F	S	K
								S	Y
									G
10 20 30									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TGTCTTGGGTTCGCCAGGCCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTAGTGGGAGTCGCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCAG									
M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K
									L
									E
									W
									V
									A
									T
									I
									S
									S
									G
									S
									R
40 50 60									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ATTCACCACATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAAATGAGGCACTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTTCAATTAGCTGG									
F	T	I	S	R	D	N	A	K	N
									T
									L
									Y
									L
									Q
									M
									S
									K
									N
									T
									A
									M
									Y
									Y
									C
									S
									I
									S
									W
70 80 90									
310	320	330	340	350					
GACGGTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:28)									
D	G	A	M	D	Y	W	G	Q	G
									T
									S
									V
									T
									Y
									S
									S
									W
100 110 113									

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

ФИГУРА 9

IPN002 VH Вариант 2

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																																	
GAGGTTCATCTGGTGGAGTCTGGGGAGCCTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA <u>GTT</u> CAG <u>TAAATA</u> GGCA																																										
E	V	H	I	V	E	S	G	G	A	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	S	F	S	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>G</u>										
										10											20											30										
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																																	
TGTCTTGGGTTGCCAGGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTG <u>C</u> CAACCATTAGTAGTAGTAGTG <u>G</u> GAGTCG <u>C</u> ACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCAG																																										
M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	R	T	Y	Y	P	D	S	V	K	G	R										
										40											50	52	A											60								
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																																	
ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCC <u>T</u> G <u>A</u> CTGCAA <u>A</u> ATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACAGCCATGTATTACTGTTCAATT <u>AGC</u> GG																																										
F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	M	Y	Y	C	S	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>W</u>										
										70											80	82	A	B	C											90						
310	320	330	340	350																																						
GACGGTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCACCG <u>T</u> CACCG <u>T</u> CTCCTCA (SEQ ID NO:29)																																										
D	G	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S											(SEQ ID NO:37)															
										100											110											113										

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

ФИГУРА 10

IPN002 VH ' Вариант 3

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																														
GAGGTTCA <u>G</u> CTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA <u>G</u> TAAATATGGCA																																							
E	V	Q	L	V	E	S	G	G	A	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	S	F	S	K	Y	G							
										10											20											30							
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																														
TGTCTTGGGT <u>C</u> CCCAGGGCCCCAGGA <u>A</u> AGGGCCTGGAGTGGT <u>C</u> CCACC <u>A</u> ATTAGTAGT <u>A</u> GTGGAGTCGCACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCAG																																							
M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T	I	S	S	G	S	R	T	Y	Y	P	D	S	V	K	G	R							
										40											50	52	A											60					
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																														
ATTCA <u>C</u> CCATCTCCAGACACA <u>A</u> ATGCCAAC <u>A</u> AC <u>A</u> CCCTGTAC <u>C</u> CT <u>C</u> AA <u>A</u> AT <u>G</u> AAC <u>A</u> ACT <u>C</u> T <u>G</u> AG <u>A</u> CC <u>G</u> AG <u>A</u> CAC <u>A</u> GC <u>C</u> AT <u>G</u> T <u>A</u> TT <u>A</u> CT <u>G</u> TT <u>C</u> AA <u>A</u> TT <u>A</u> CT <u>G</u> CG																																							
F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	M	Y	Y	C	S	I	S	W							
										70											80	82	A	B	C											90			
310	320	330	340	350																																			
GACGGTG <u>C</u> TAT <u>G</u> GACT <u>A</u> CT <u>G</u> GGT <u>C</u> A <u>AG</u> GG <u>A</u> CC <u>AC</u> CG <u>T</u> C <u>AC</u> CG <u>T</u> C <u>CT</u> CT <u>C</u> TA (SEQ ID NO:30)																																							
D	G	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO:38)																						
										100											110											113							

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.

CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

ФИГУРА 11

IPN002 VH Вариант 4

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAGGTTCAGCTGGTGGAGTC <u>TGGGGGAGC</u> TTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA <u>GTTCA</u> GTAAATATGGCA									
E	V	Q	L	V	E	S	G	G	A
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100									
TGTCTTGGGTTGCCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTGGACTGGGT <u>CGCAACCATTAGTAGTAGT</u> AGTGGAGTCCCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCAG									
M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200									
ATTCA <u>CCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCC</u> GTACCTGCAA <u>ATGAA</u> CAGTCTGAGAGCCGAGGACACAGCCATGTAA <u>TACTGTGCCATTAGCTGG</u>									
F	T	I	S	R	D	N	A	K	N
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300									
D									
G									
A									
M									
D									
Y									
W									
G									
Q									
G									
T									
T									
V									
T									
V									
S									
S									
70 80 82 A B C 90									
310 320 330 340 350									
GACGGTGCTATGGACTACTGGGTCAAGGGACCACCGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:31)									
D									
G									
A									
M									
D									
Y									
W									
G									
Q									
G									
T									
T									
V									
T									
V									
S									
S									
100 110 113									

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
 CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

ФИГУРА 12

IPN002 Vk Вариант 1

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTTGATGACCCAAAGCCC	ACTCTCCCTGCCTGTCACCCTTGGACAGCCCCGC	CTCCATCTCTTGCA	AAATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATG						
D V L M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S I V H S N									
		10			20			27	A B C D E
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAACACCTATTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGGTCTACAAAGTTCCAATCGATTCTGGGTCCCAGACAGATT									
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L V Y K V S N R F S G V P D R F									
30		40			50			60	
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAACTTATTACTGCTTTCAAGGCTCACTTGTCC									
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G T Y Y C F Q G S L V P									
70				80			90		
310	320								
TGGGCCGTTCGGTGGAGGCCAACCAAGGTGGAAATCAA (SEQ ID NO:32)									
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:40)									
100		106	A						

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
 CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

ФИГУРА 13

IPN002 Vk Вариант 2

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTGTGATGACCCAAAGCCCAC	TCTCCCTGCCTGT	CACCCTGGACAGCCCCC	GCTCCATCTCTTGCA	AAATCTAGTCAGAGCATT	GTACATACTAATG				
D V V M T Q S P L S	L P V T L G Q P A	S I S C K S S Q S	I V H S N						
	10			20			27	A B C D E	
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAACACCTATTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGGTCTACAAAGTTCCAATCGATT	TTCTGGGGTCCCAGACAGATT								
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L V Y K V S N R F S G V P D R F									
30		40			50			60	
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGGCTGAGGATGTGGGA	ACTTATTACTGCTTTCAAGGCTCACTTGTTCC								
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G T Y Y C F Q G S L V P									
70		80			90				
310	320								
<u>TGGGCCGTT</u> CGGTGGAGCCACCAAGGTGGAAATCAA	AA (SEQ ID NO:33)								
<u>W A F G G G T K V E I K</u>	(SEQ ID NO:41)								
100		106	A						

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
 CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

ФИГУРА 14

IPN002 Vk Вариант 3

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTGTGATGACCCAAAGCCC	ACTCTCCCTGCCTGTCA	CACCCTTGGACAGCCCCC	GCTCCATCTCTTGCA	AATCTAGTCAGAGCATT	GTACATAGTAATG				
D V V M T Q S P L S L P	V T L G Q P A S I S C	K S S Q S I V H S N							
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAACACCTATTAGAATGGTAC	CTGCAGAAACCAGGCC	AGTCTCCACAGCTCCTGG	TACAAGTTCCAATCGAT	TTCTGGGGTCCCAGACAG	ATTG				
G N T Y L E W Y L Q K P	G Q S P Q L L V Y K	V S N R F S G V P	D R F						
30	40	50	60						

210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CAGTGGCA	GTGGATCAGGGACAGATT	TCACACTCAAGATCAGCAGA	GTGGAGGCTGAGGA	TGTATTACTGCTTTCA	AGGCTCACTTGTTCT				
S G S G S G T D F T L K	I S R V E A E D V	G V Y Y C F Q G S L	V P						
70	80	90							

310	320								
<u>TGGGC</u> GTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAA	(SEQ ID NO:34)								
<u>W A F G G T K V E I K</u>	(SEQ ID NO:42)								
100	106 A								

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

ФИГУРА 15

IPN002 Vк Вариант 4

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTGTGATGACCCAAAGCCCAC	TCTCCCTGCCTGTCACCCTGGACAGCCCCGC	CATCTCTTGCAAA	ATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATG						
D Y V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S T V H S N									
	10				20				
						27	A B C D E		
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
CAAACACCTATTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTCCAATCGATTCTGGGTCCCAGACACATT									
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F									
	30		40		50				60
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCAACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGCTCACTTGTTCCT									
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S L V P									
	70			80					90
310	320								
TGGGCGTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAA (SEQ ID NO:35)									
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:43)									
	100		106	A					

26/73

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты

ФИГУРА 16

Таблица 4: Связывание вариантов IPN002 с Tay-белками

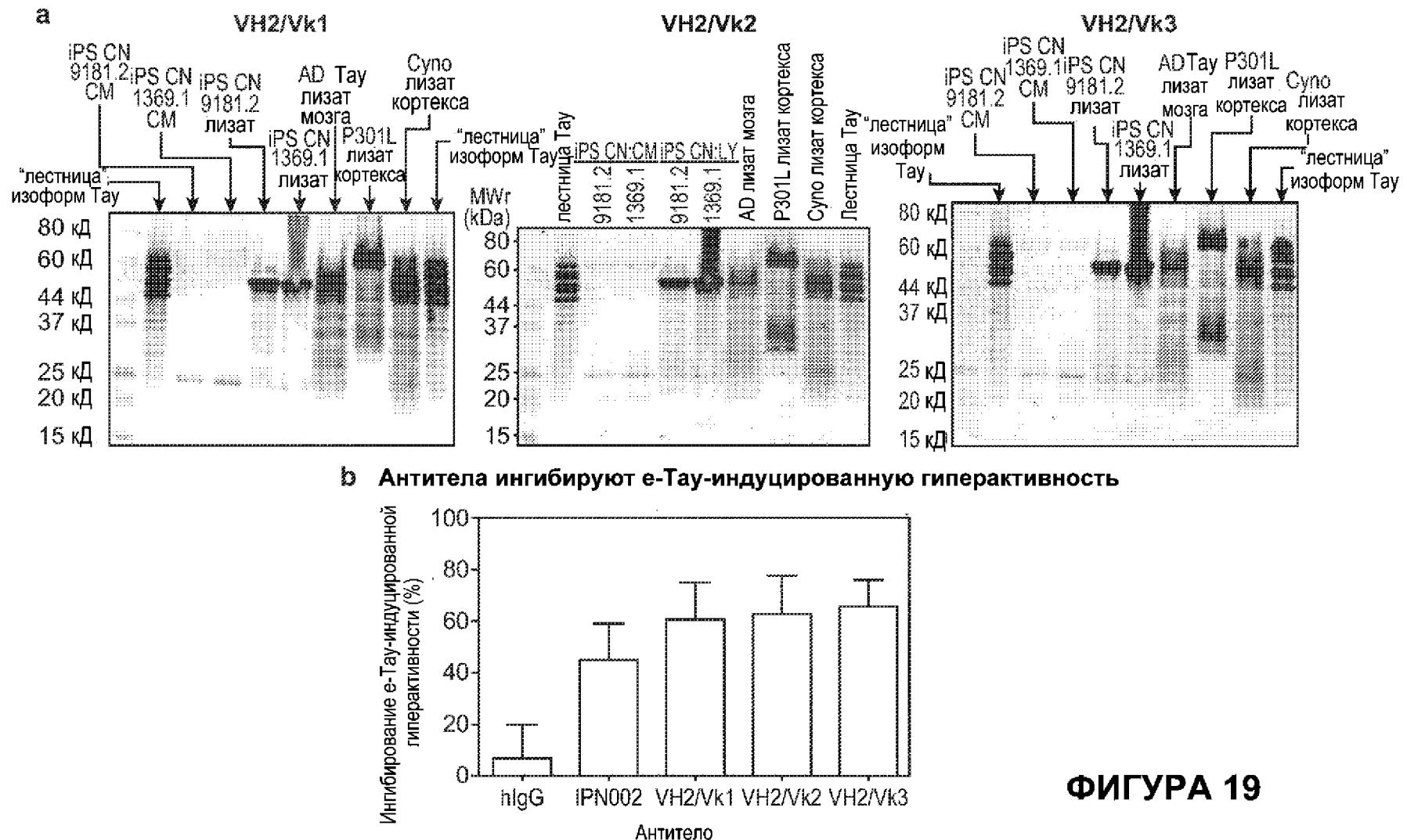
Антитело	K_D значения (M)					
	rTay383	e Tay 1a	e Tay 1b	e Tay 2	e Tay 4	e Tay 4
VH1/Vk1	1.83E-10	2.94E-10	7.37E-10	4.65E-10	3.58E-10	5.77E-10
VH1/Vk2	1.21E-10	2.12E-10	5.58E-10	3.61E-10	3.21E-10	6.33E-10
VH1/Vk3	1.75E-10	2.91E-10	5.90E-10	4.44E-10	4.78E-10	7.61E-10
VH1/Vk4	2.86E-10	2.52E-10	5.97E-10	4.27E-10	2.69E-10	8.69E-10
VH2/Vk1	2.42E-10	2.81E-10	2.15E-10	2.25E-10	3.69E-10	3.21E-10
VH2/Vk2	1.99E-10	3.27E-10	2.29E-10	2.83E-10	2.94E-10	3.94E-10
VH2/Vk3	2.23E-10	3.27E-10	2.87E-10	2.61E-10	2.19E-10	4.11E-10
VH2/Vk4	2.48E-10	3.43E-10	5.20E-10	3.54E-10	4.18E-10	6.71E-10
VH3/Vk1	2.36E-10	2.41E-10	5.29E-10	7.05E-10	4.54E-10	9.21E-10
VH3/Vk2	2.58E-10	2.82E-10	6.14E-10	4.08E-10	5.89E-10	7.01E-10
VH3/Vk3	2.24E-10	2.20E-10	6.89E-10	4.71E-10	4.69E-10	6.65E-10
VH3/Vk4	2.55E-10	2.16E-10	3.82E-10	4.47E-10	3.81E-10	5.86E-10
VH4/Vk1	1.87E-10	1.98E-10	3.59E-10	4.05E-10	2.80E-10	4.98E-10
VH4/Vk2	1.60E-10	1.91E-10	4.83E-10	4.51E-10	2.91E-10	4.67E-10
VH4/Vk3	2.76E-10	1.78E-10	3.13E-10	4.73E-10	6.36E-10	6.29E-10
VH4/Vk4	3.79E-10	3.25E-10	5.35E-10	5.64E-10	4.62E-10	1.03E-09

ФИГУРА 17

Таблица 5: Связывание вариантов гуманизированного IPN002 с Tay383

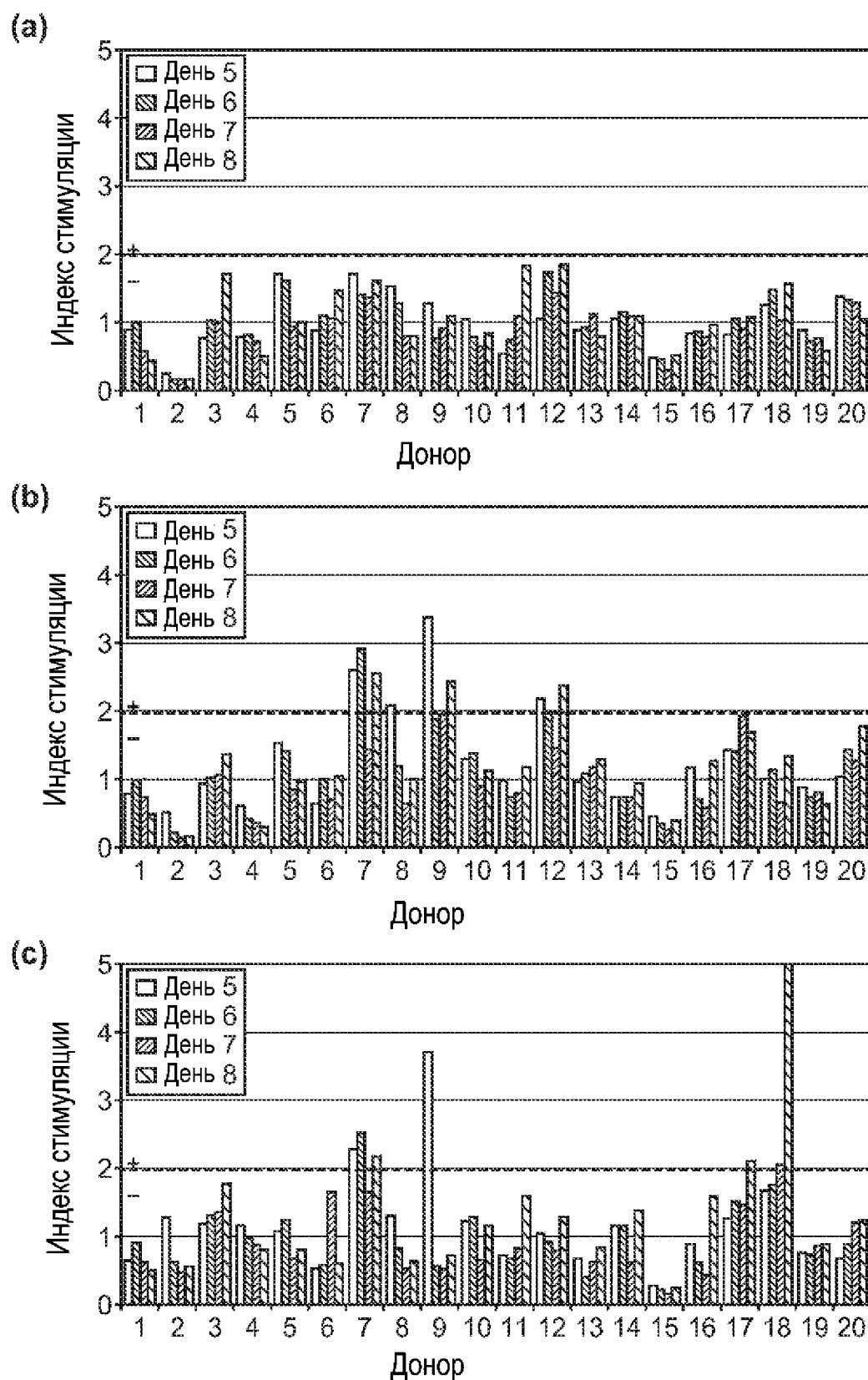
Антитело	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
VH1/VK1	4.26E-11	2.06E+05	8.75E-06
VH1/VK2	4.46E-10	1.96E+05	8.74E-05
VH1/VK3	1.28E-09	1.82E+05	2.33E-04
VH1/VK4	5.71E-10	1.67E+05	9.52E-05
VH2/VK1	4.67E-10	2.14E+05	1.00E-05
VH2/VK2	2.32E-10	2.05E+05	4.75E-05
VH2/VK3	1.73E-09	1.34E+05	2.32E-04
VH2/VK4	1.66E-09	1.42E+05	2.36E-04
VH3/VK1	1.99E-09	1.29E+05	2.57E-04
VH3/VK2	5.77E-10	1.85E+05	1.07E-04
VH3/VK3	1.69E-10	1.87E+05	3.15E-05
VH3/VK4	4.75E-10	2.11E+05	1.00E-04
VH4/VK1	2.12E-09	1.40E+05	2.97E-04
VH4/VK2	1.88E-09	1.63E+05	3.07E-04
VH4/VK3	5.71E-10	1.64E+05	9.39E-05
VH4/VK4	8.12E-10	1.56E+05	1.26E-04
IPN002	2.06E-10	2.33E+05	4.78E-05

ФИГУРА 18

**ФИГУРА 19**

фетальный	MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
#2	AEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
#3	AEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
#4	AEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
e-Tay 2-172	AEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
e-Tay 2-176	AEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
фетальный	AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPA
#2	AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPA
#3	AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPA
#4	AGHVTQAR (68) (SEQ ID NO: 48)
e-Tay 2-172	AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPA
e-Tay 2-176	AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPA
фетальный	PKTPPSSGEPPKGDRSGYSSPGSPGTPGSRSLPTPPTRPKVAVVRTPPKSPSSA
#2	PKTPPSSGEPPKGDRSGYSSPGSPCTPGSR (151) (SEQ ID NO: 46)
#3	PK (122) (SEQ ID NO: 47)
e-Tay 2-172	PKTPPSSGEPPKGDRSGYSSPGSPGTPGSRSLPTPPTRPKVAVVR (SEQ ID NO: 44)
e-Tay 2-176	PKTPPSSGEPPKGDRSGYSSPGSPGTPGSRSLPTPPTRPKVAVVRTPPK (SEQ ID NO: 45)
фетальный	KSRLQTAPVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIIHK
фетальный	PGGGQVEVKSEKIDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEI
фетальный	VYKSPVVSGDTSRHLNSNSTGSIDMVDSPLATLADEVASLAKQGL (SEQ ID NO: 27)

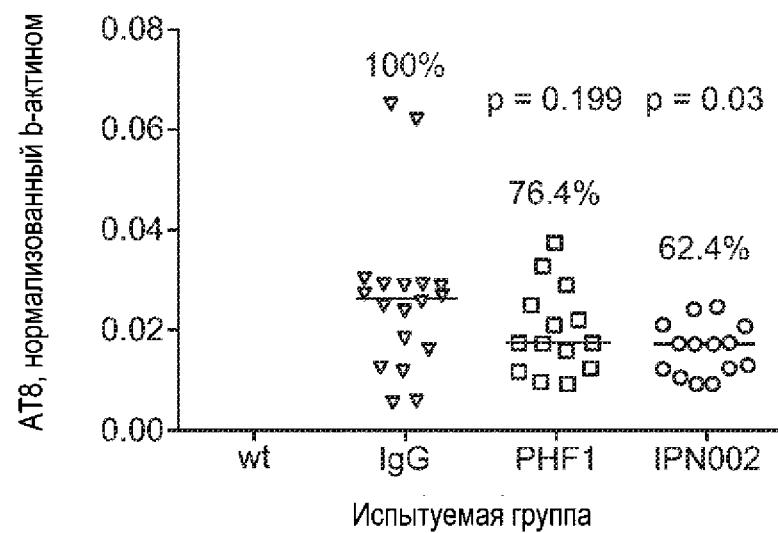
ФИГУРА 20



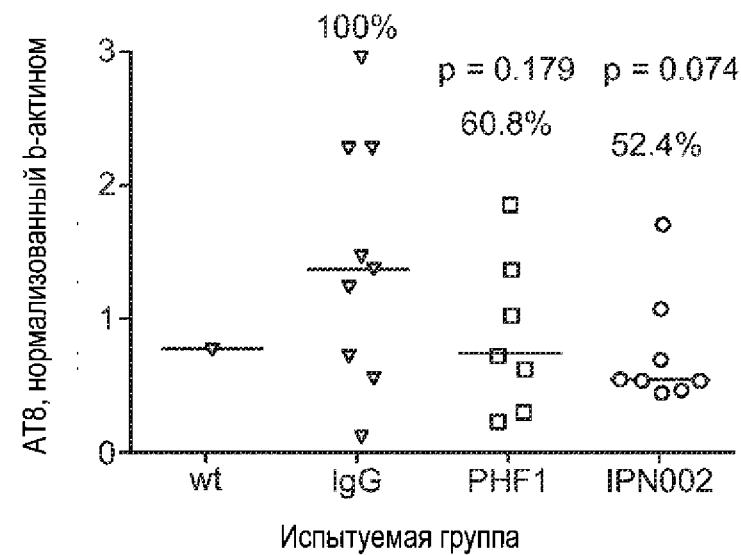
ФИГУРА 21

Солюбилизированный детергентом pTay (AT8)

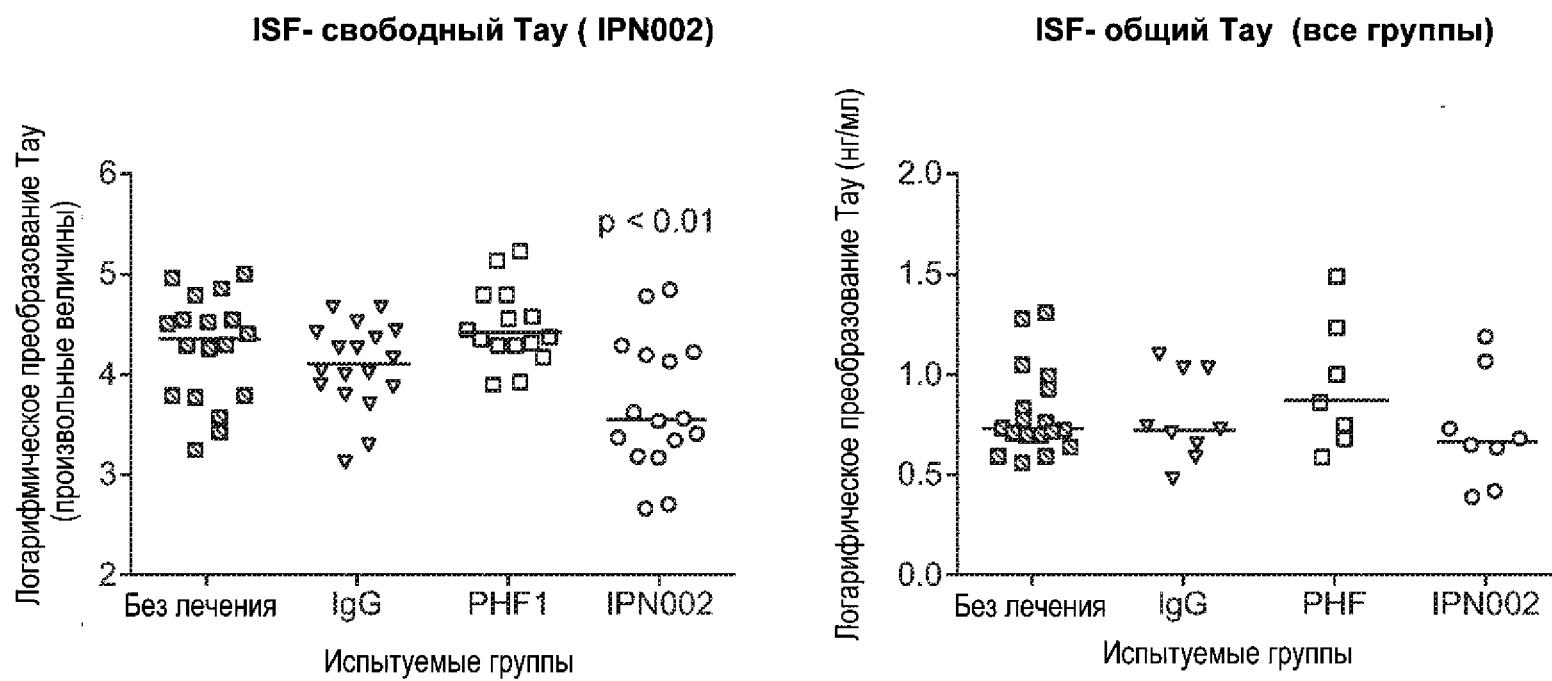
Анализ ELISA



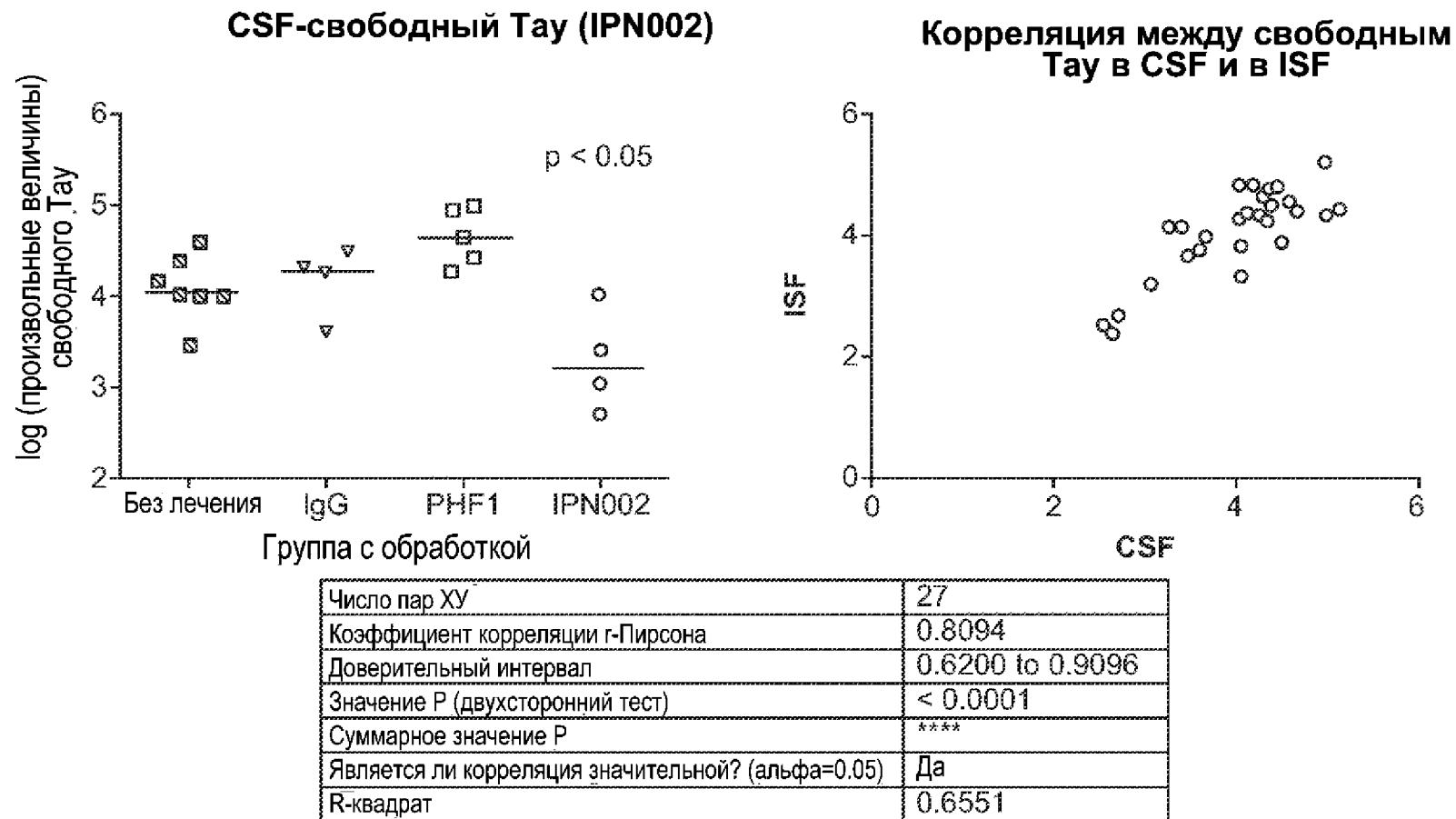
Вестерн-блоттинг

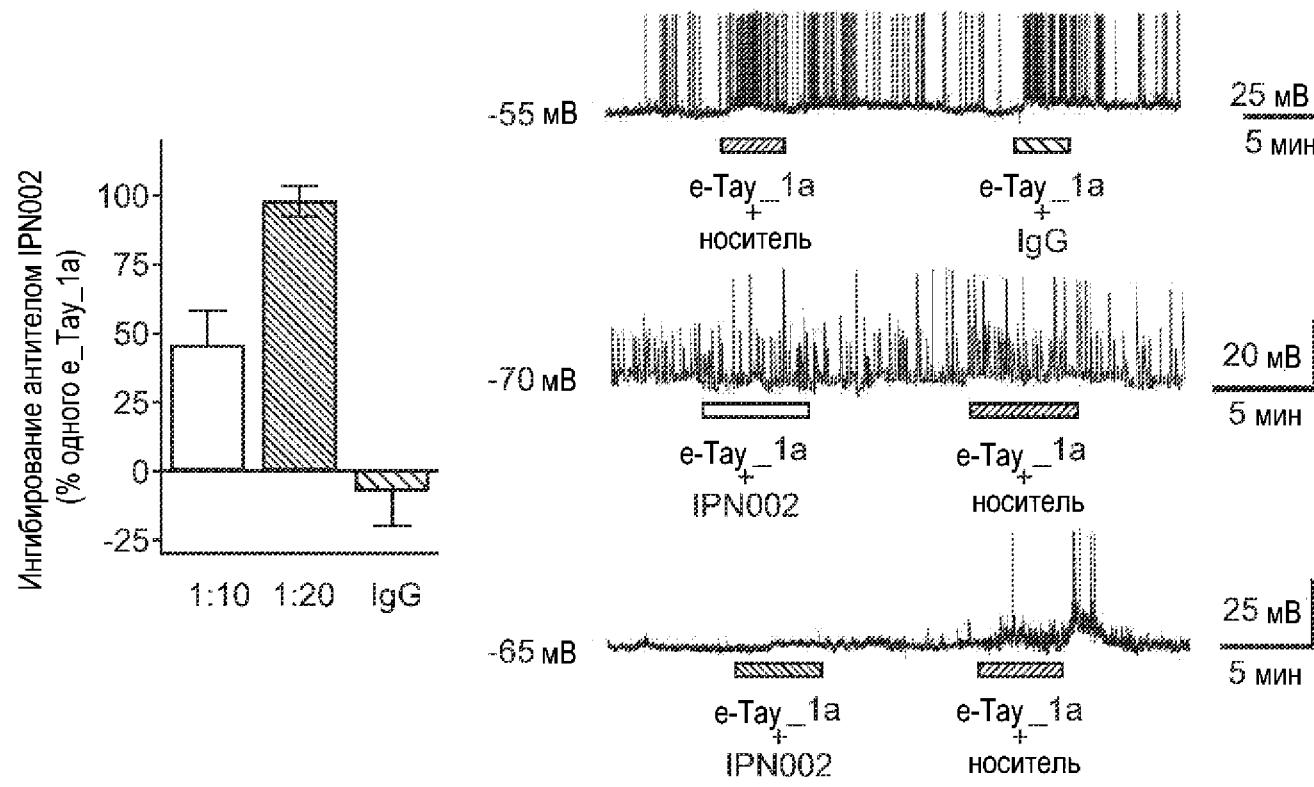


ФИГУРА 22

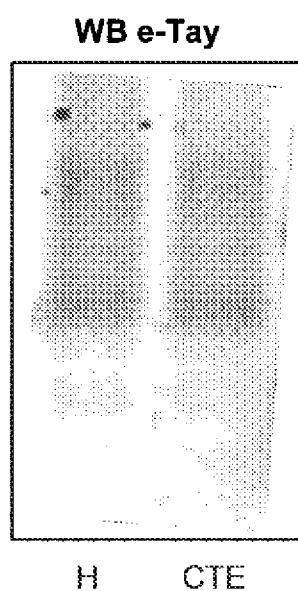


ФИГУРА 23

**ФИГУРА 24**



ФИГУРА 25



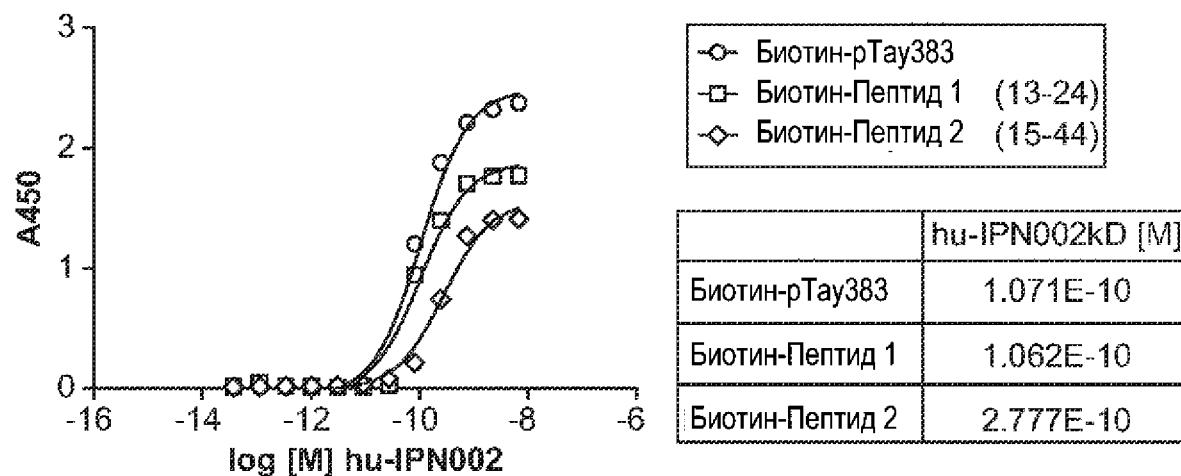
ФИГУРА 26

Синтезированные Tau-пептиды:

Пептид 1: Биотин- ahx - $^{13}\text{D}\text{HAGTYGLGDRK}^{24}$ (SEQ ID NO: 49)

Пептид 2: Биотин- ahx - $^{15}\text{AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGLTDAGLK}^{44}$ (SEQ ID NO: 50)

Твёрдофазный метод- Tau-пептиды с hu-IPN002



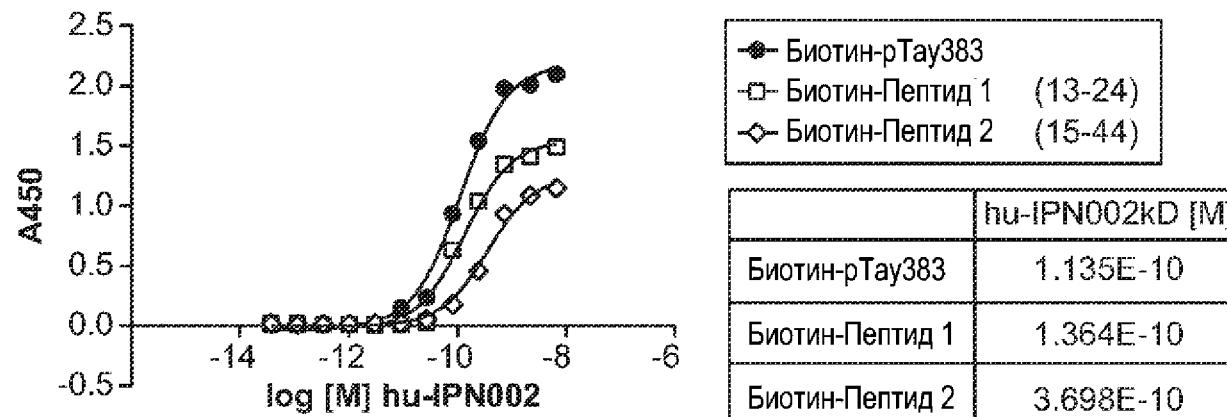
ФИГУРА 27

Синтезированные Tau-пептиды:

Пептид 1: Биотин - ahx-¹³DHAGTYGLGDRK²⁴ (SEQ ID NO: 49)

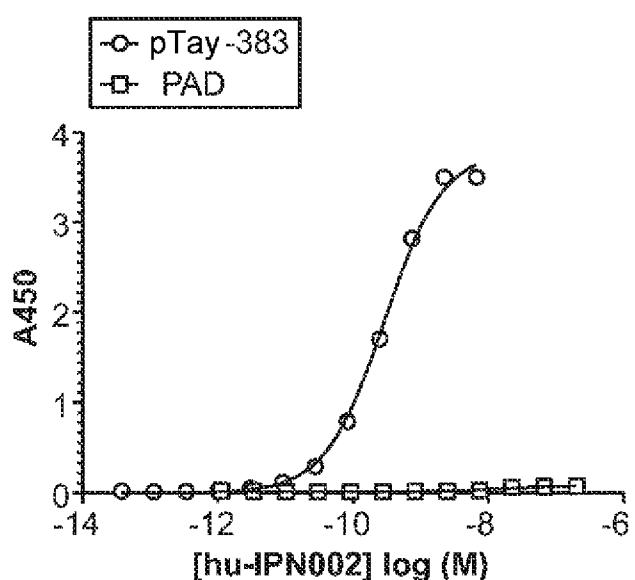
Пептид 2: Биотин - ahx-¹⁵AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGLTDAGLK²⁴ (SEQ ID NO: 50)

Жидкофазный метод - Tau-пептиды с hu-IPN002



ФИГУРА 28

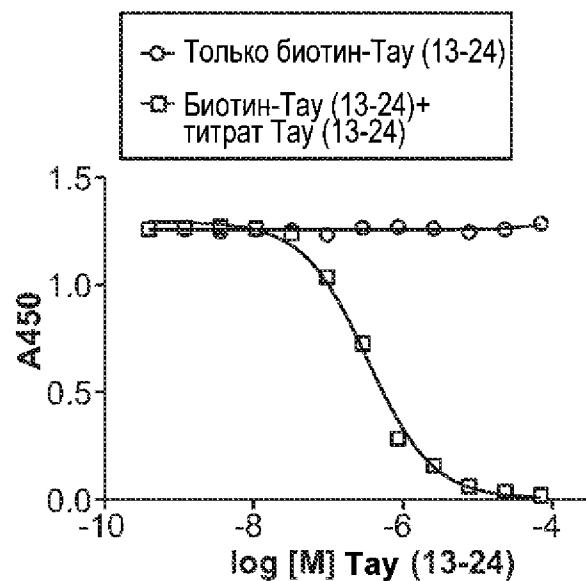
Анализ связывания с hu-IPN002



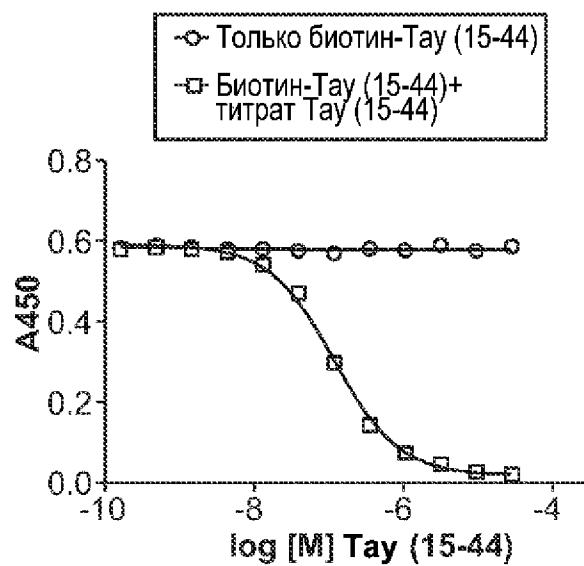
	Hu-IPN002 k_D [M]
pTay383	2.88E-10
PAD	N.O.

ФИГУРА 29

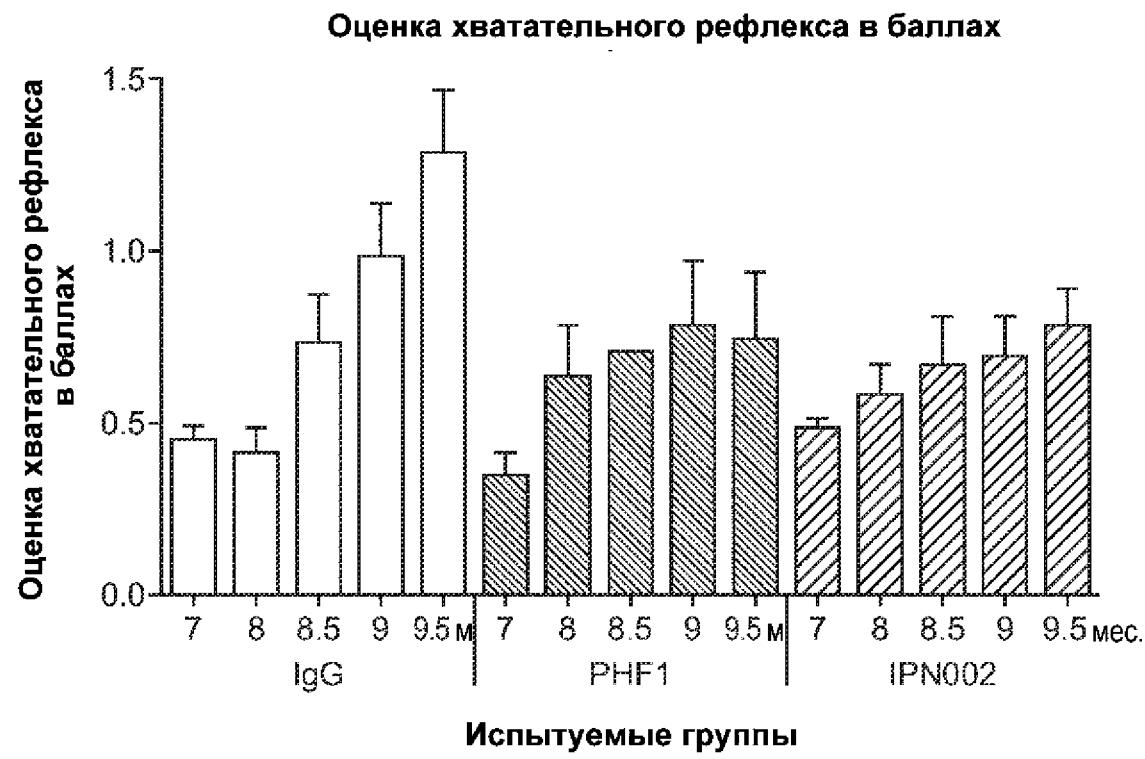
Биотин-Tay (13-24) и Tay (13-24) конкурируют за связывание с hu-IPN002



Биотин-Tay (15-44) и Tay (53-44) конкурируют за связывание с hu-IPN002

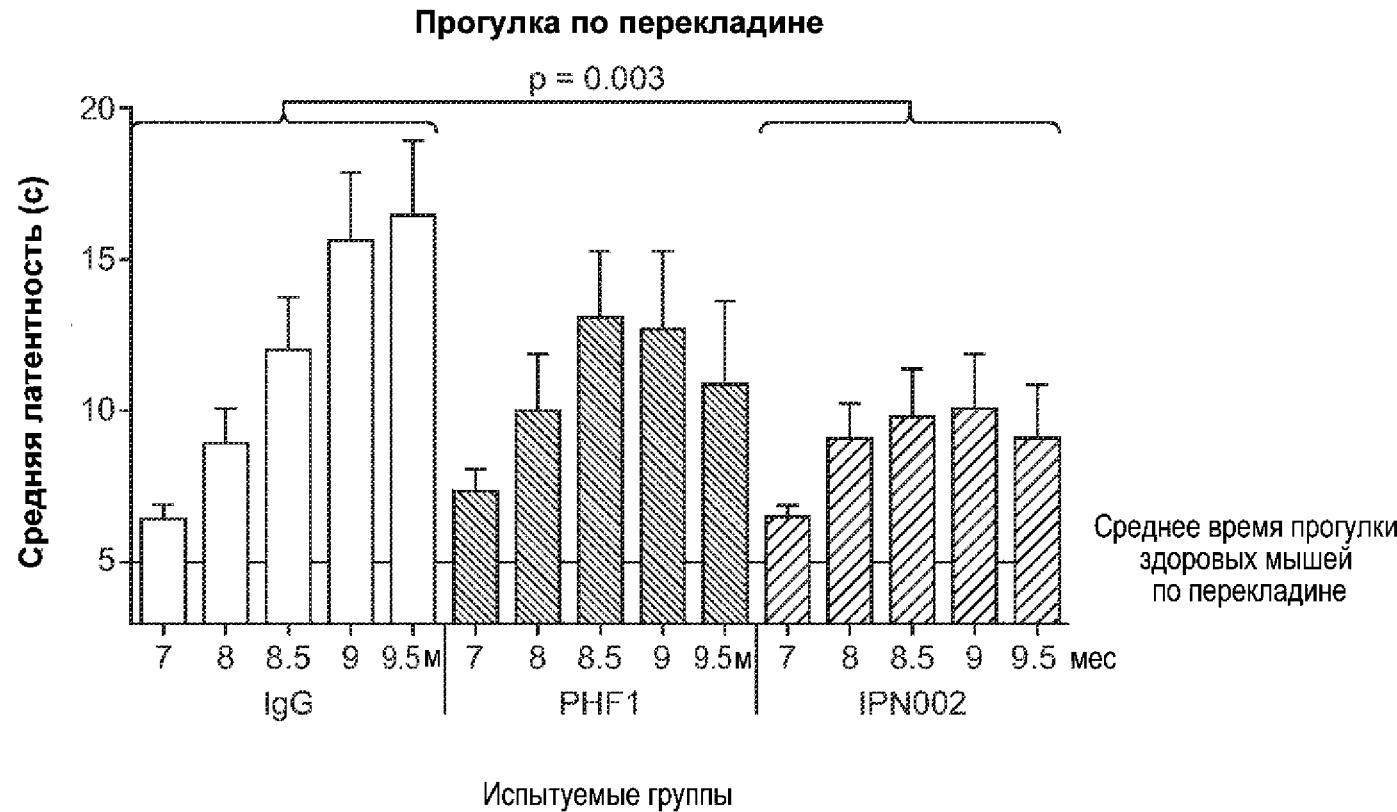


ФИГУРА 30



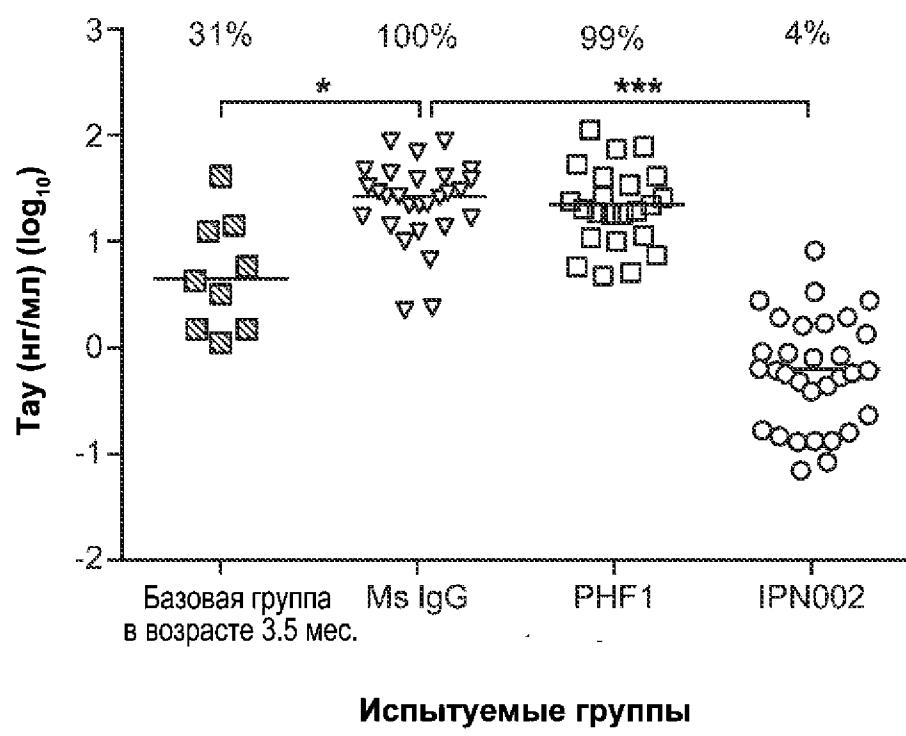
Значение p для IgG по сравнению с IPN002 приближается к статистической значимости ($p=0.056$)

ФИГУРА 31



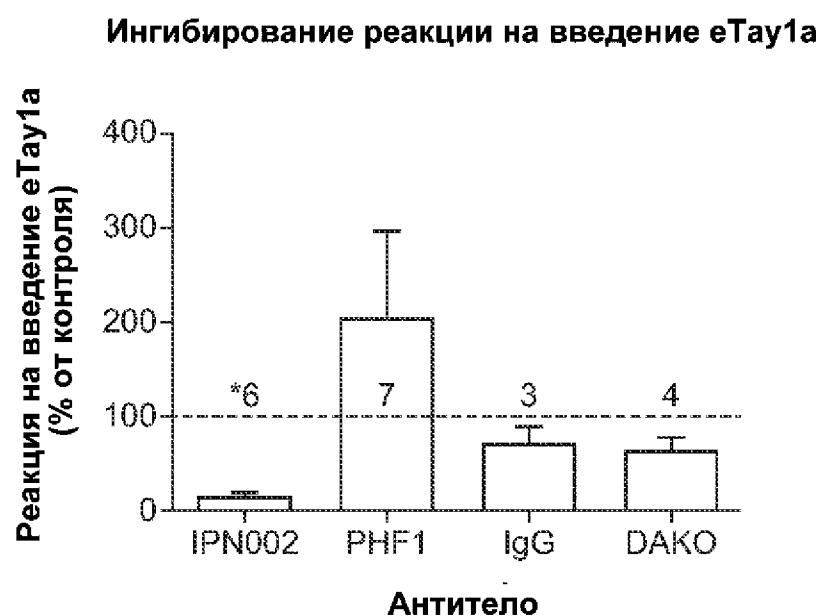
ФИГУРА 32

**Уровень свободного Tay (Tay, не связанный с IPN002)
в образцах CSF от мышей P301L**



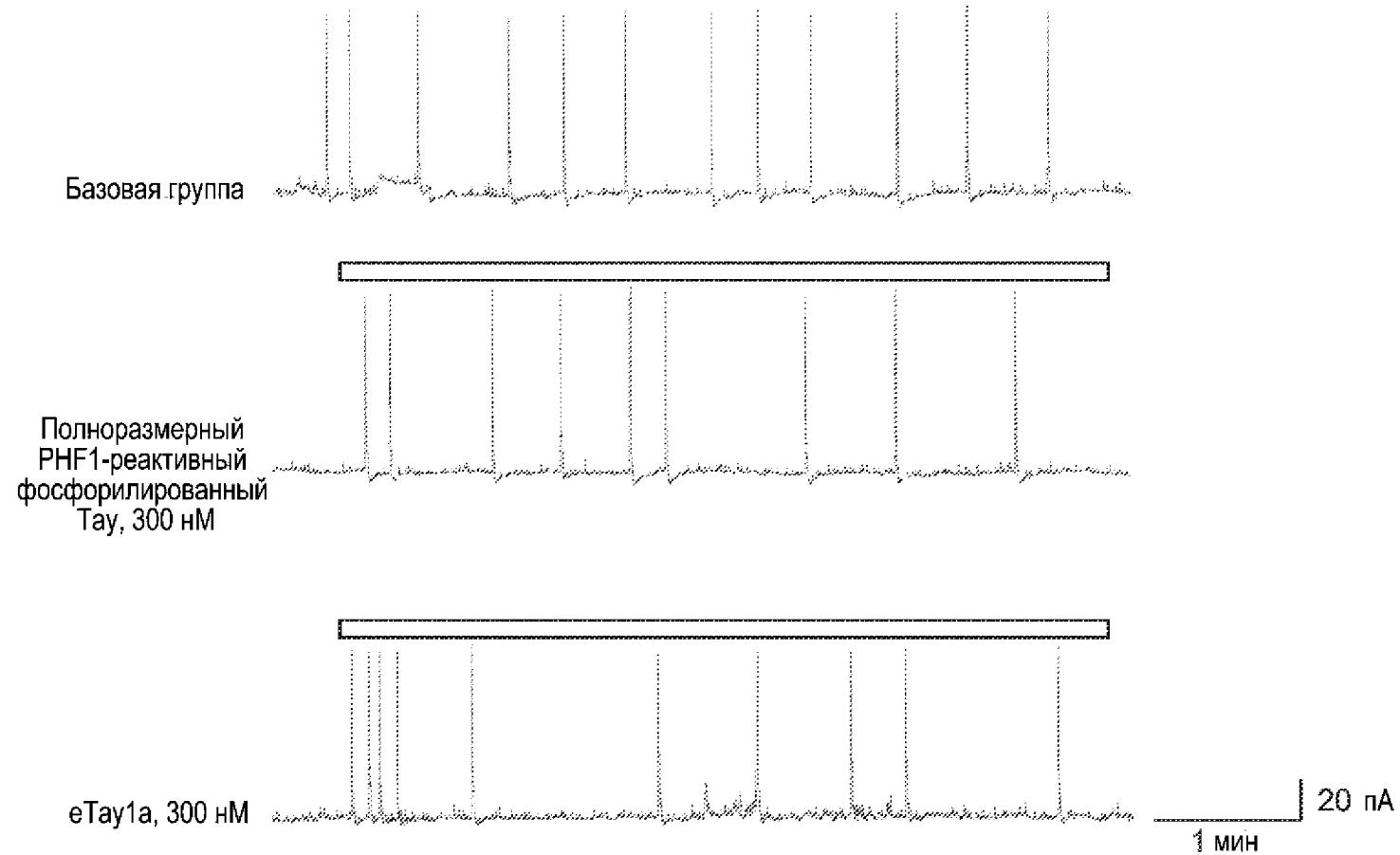
Испытуемые группы

ФИГУРА 33

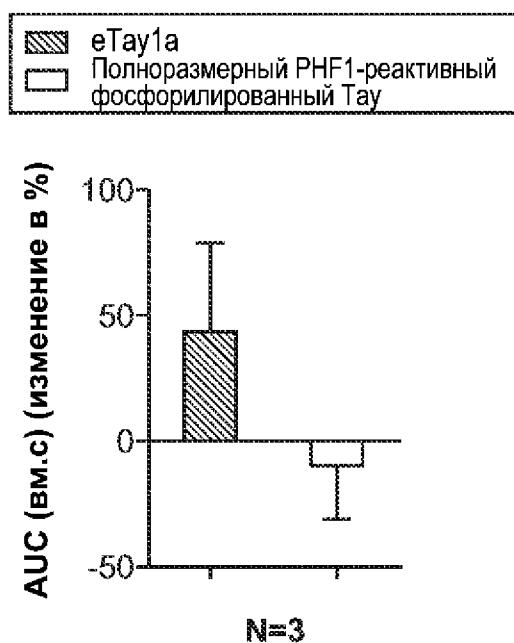


Цифры на графике показывают количество нейронов, испытанных для каждого антитела

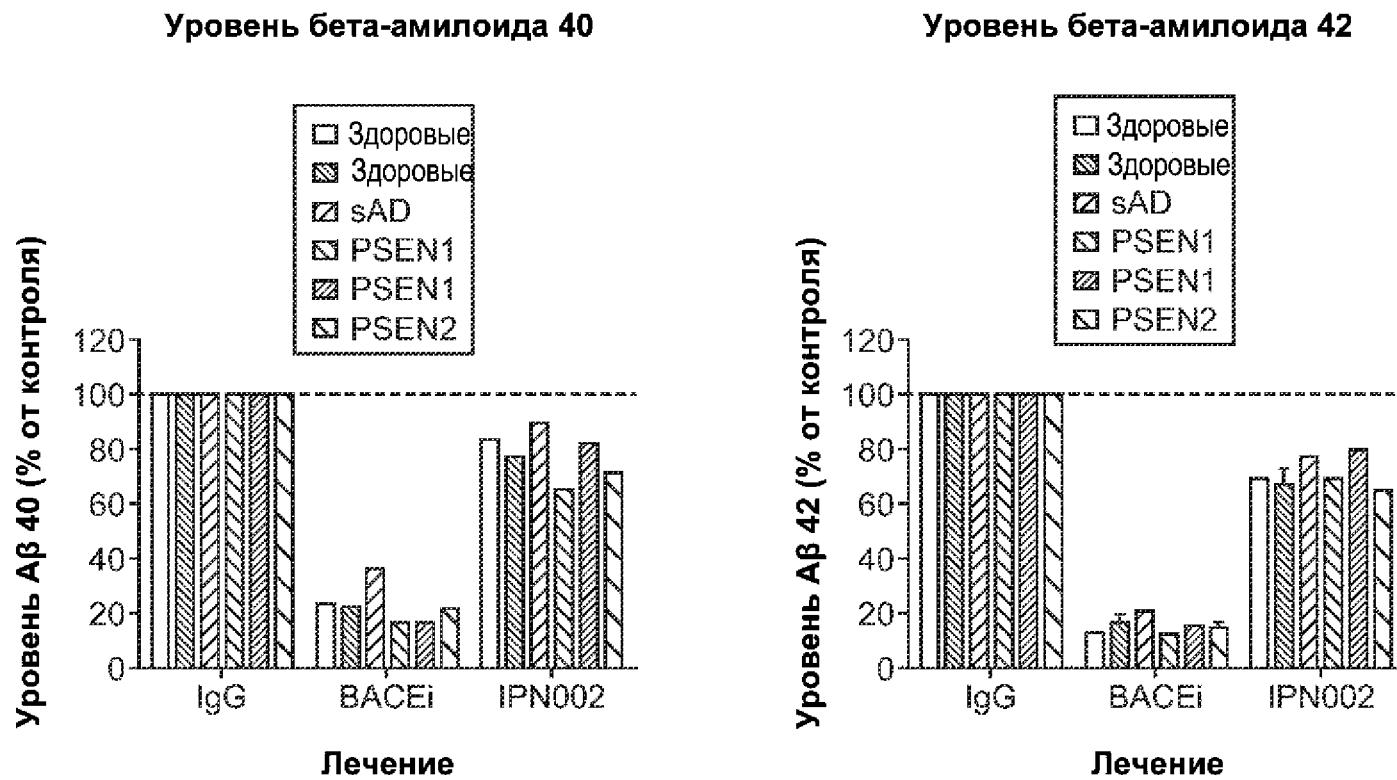
ФИГУРА 34



ФИГУРА 35

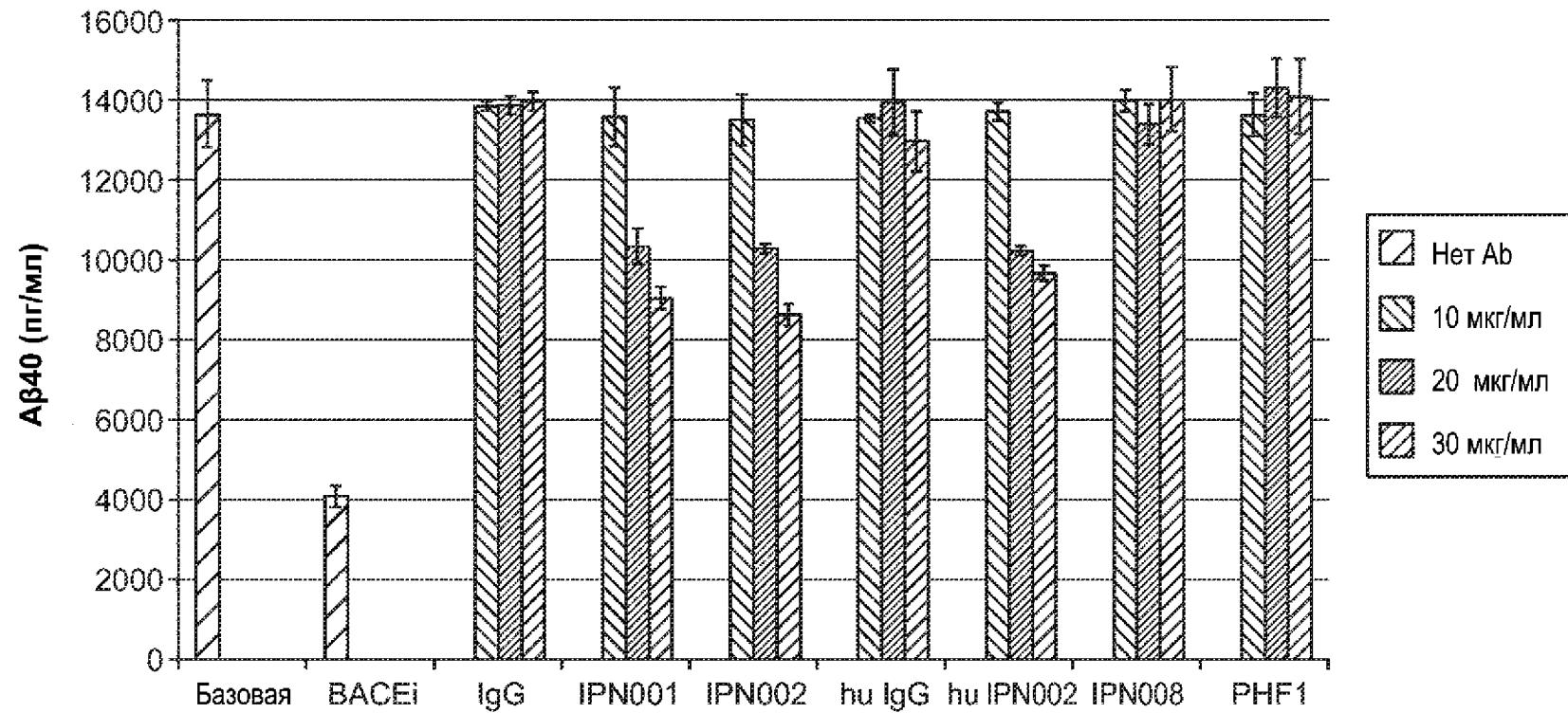


ФИГУРА 36



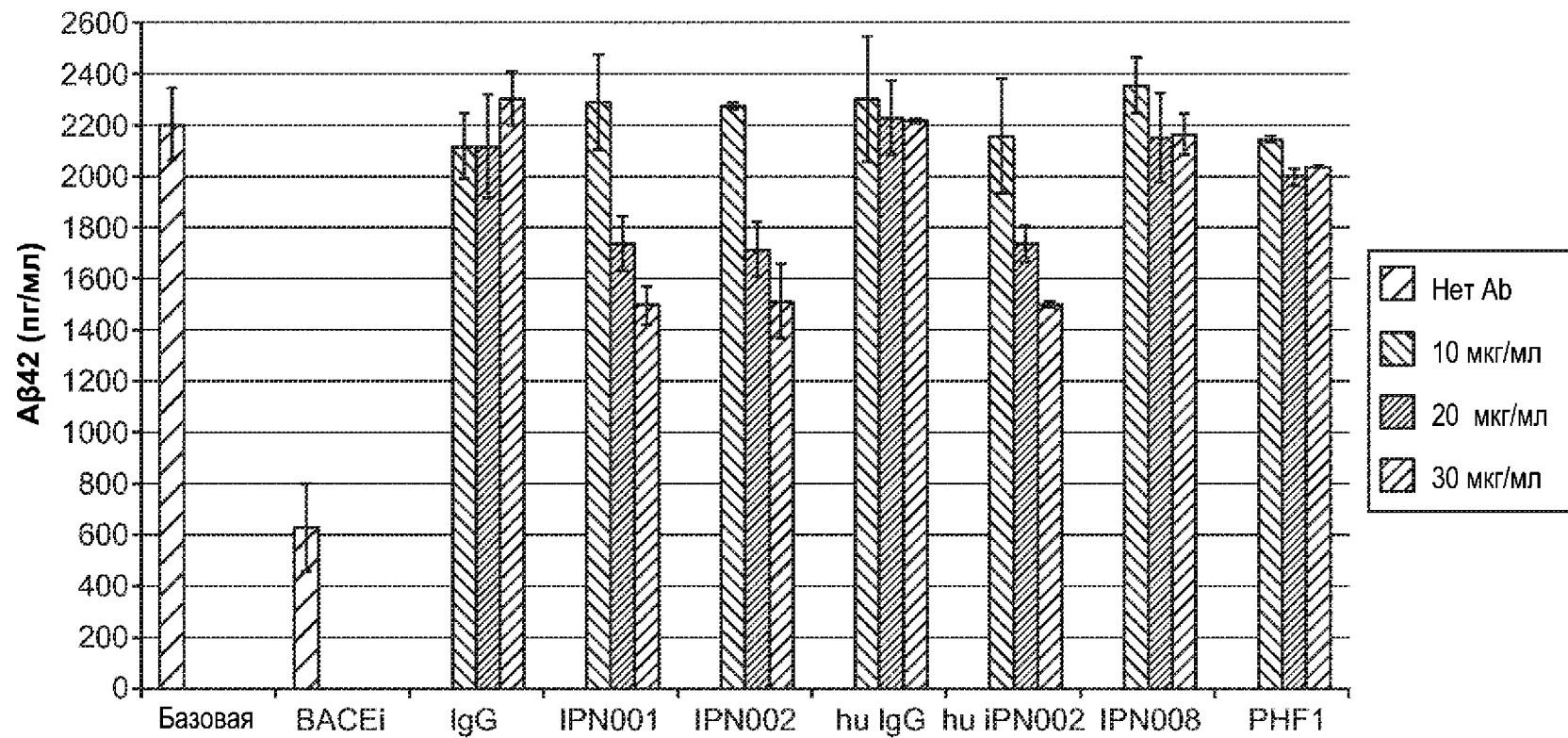
ФИГУРА 37

А β 40, секрецируемый первичными кортикальными нейронами, через 40 дн. лечения, данные ELISA



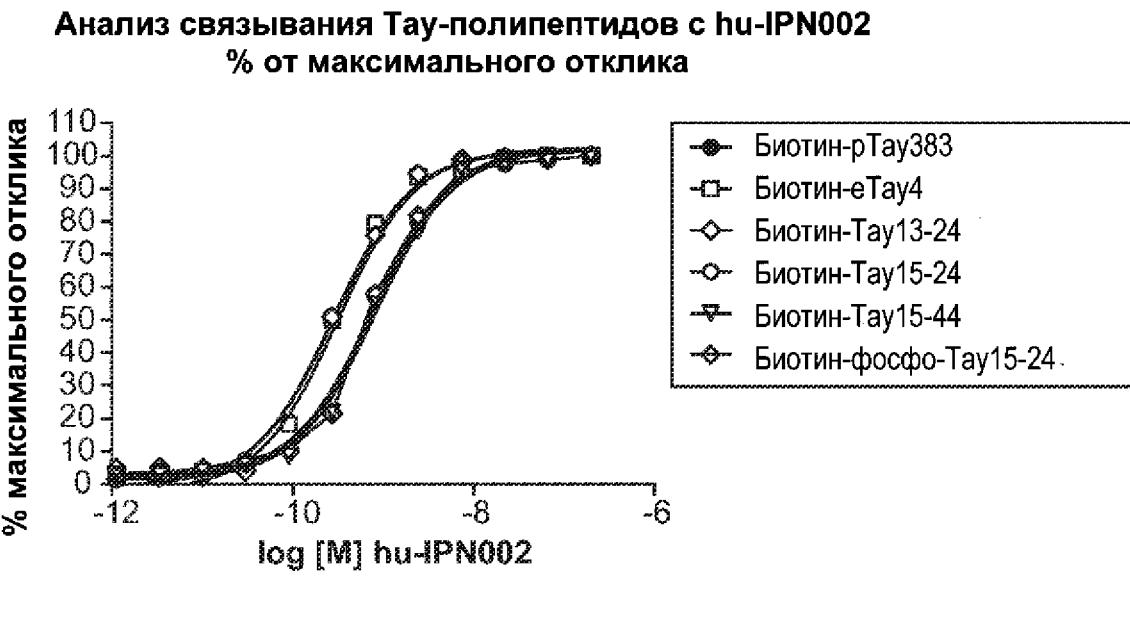
ФИГУРА 38

А β 42, секрецируемый первичными кортикальными нейронами, через 40 дн. лечения, данные ELISA



ФИГУРА 39

Биотин -*ahx*-¹³DHAGTYGLGDRK²⁴ (SEQ ID NO: 49)
 Биотин -*ahx*-¹⁵AGTYGLGDRK²⁴ (SEQ ID NO: 51)
 Биотин -*ahx*-¹⁵AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGLTDAGLK⁴⁴ (SEQ ID NO: 50)
 Биотин -*ahx*-¹⁵AGTY (phospho) GLGDRK²⁴ (SEQ ID NO: 52)

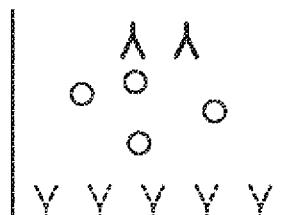


Образец	k_p [M]
Биотин-рTau383	2.83E-10
Биотин-еTau4	2.89E-10
Биотин-Tay13-24	3.18E-10
Биотин-Tay15-24	7.54E-10
Биотин-Tay15-44	8.13E-10
Биотин-Tay15-24 ФОСФО	7.68E-10

ФИГУРА 40

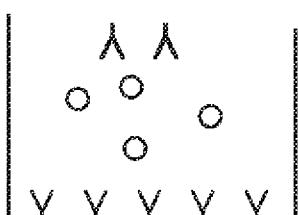
Анализ связывания антитела с Tay в CSF

Детекция с помощью анти-Tay,
меченного биотином,
неконкурентным методом



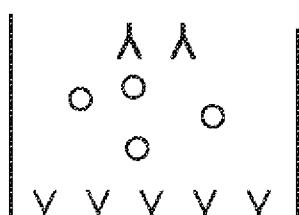
IgG

Детекция с помощью анти-Tay,
меченного биотином,
неконкурентным методом



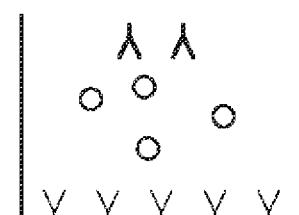
*polyAb-C- концевой Tay

Детекция с помощью анти-Tay,
меченного биотином,
неконкурентным методом



PHF1

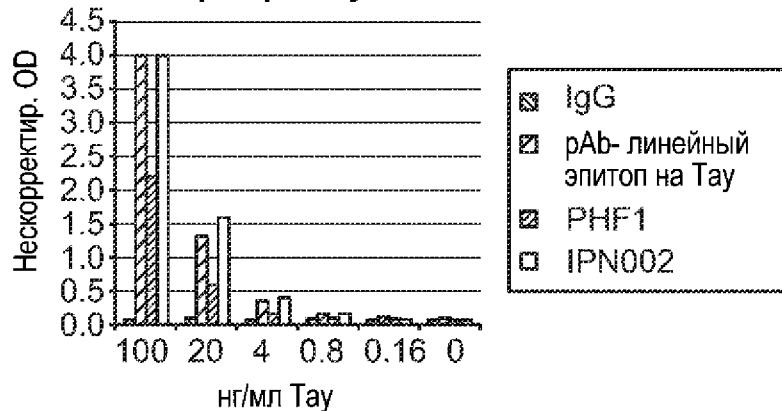
Детекция с помощью анти-Tay,
меченного биотином,
неконкурентным методом



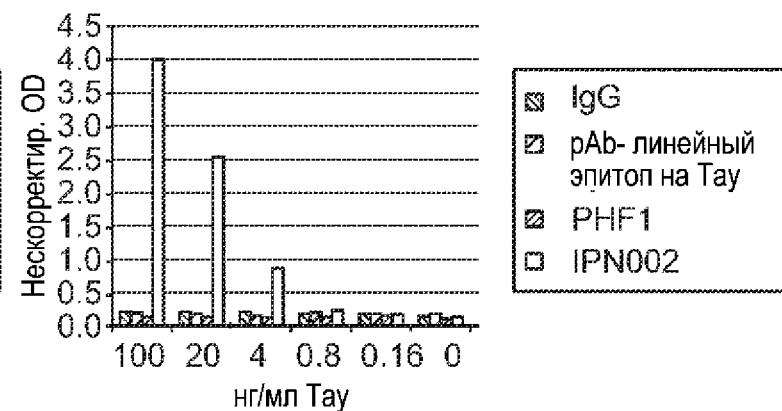
IPN002

Связывание антител с Tay

Связывание с полноразмерным фосфо-Tay

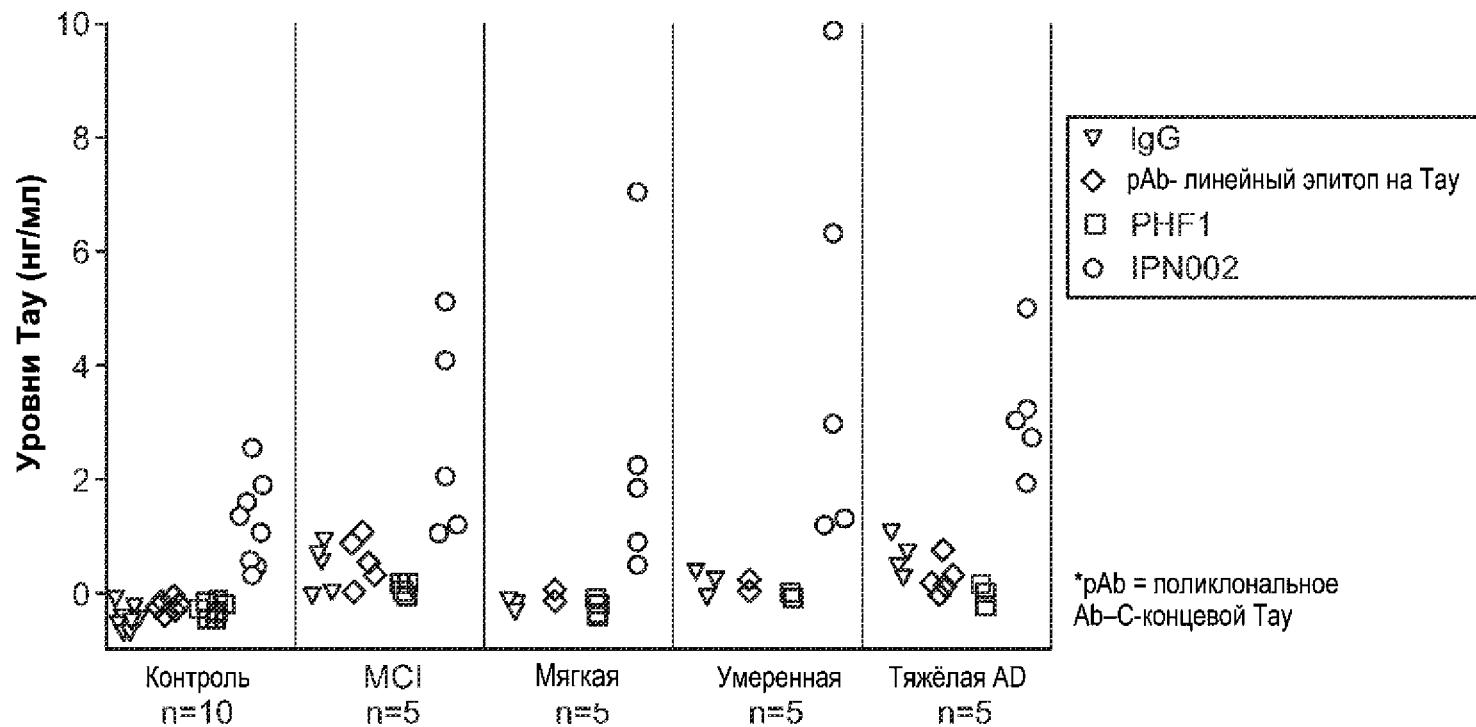


Связывание с eTay 1a



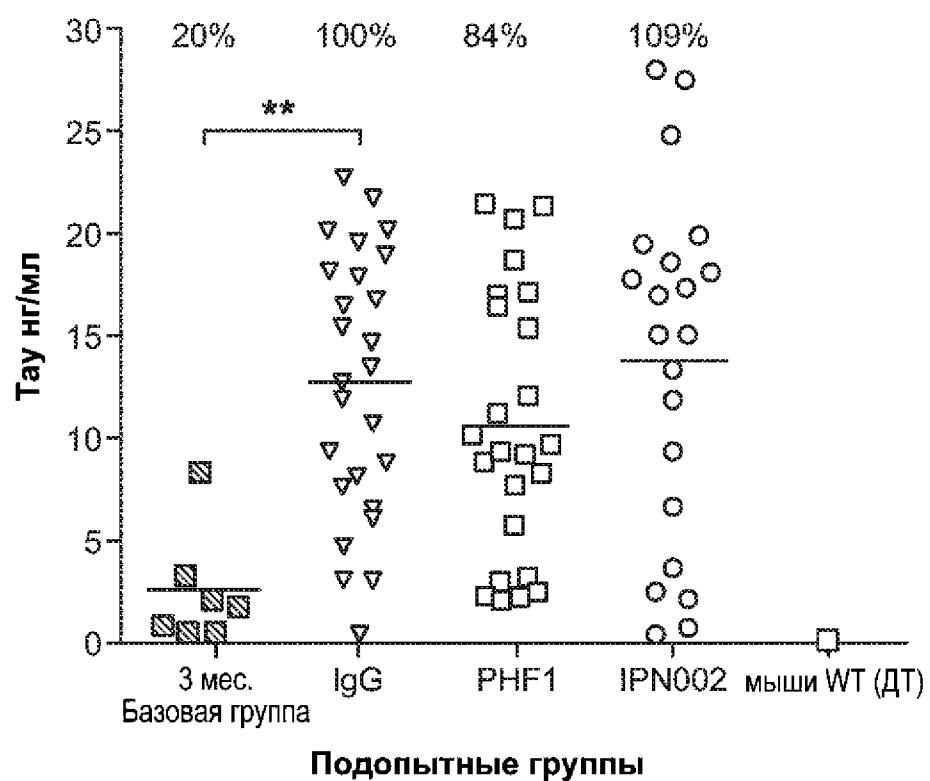
ФИГУРА 41

Tau в CSF связывается с IPN002, но не с Tau pAb, ни с PHF1



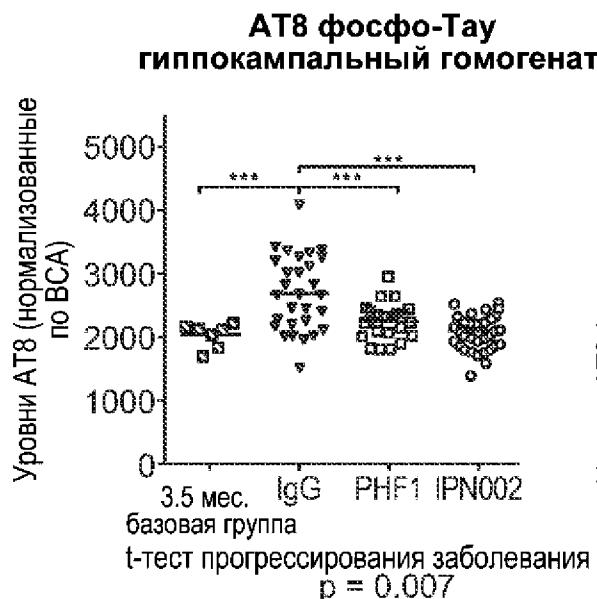
ФИГУРА 42

Уровни тотального Tay в образцах CSF

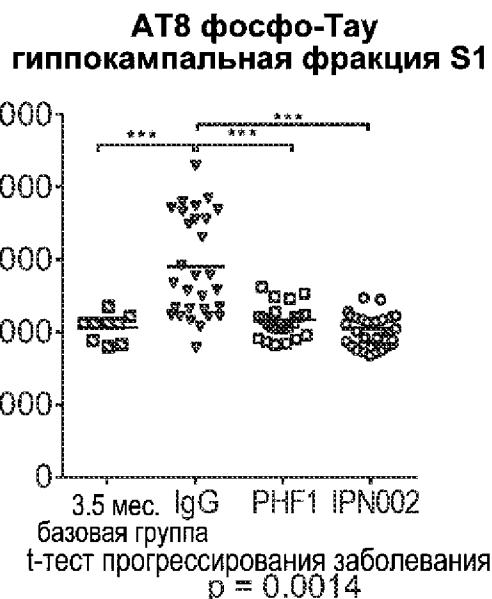


ФИГУРА 43

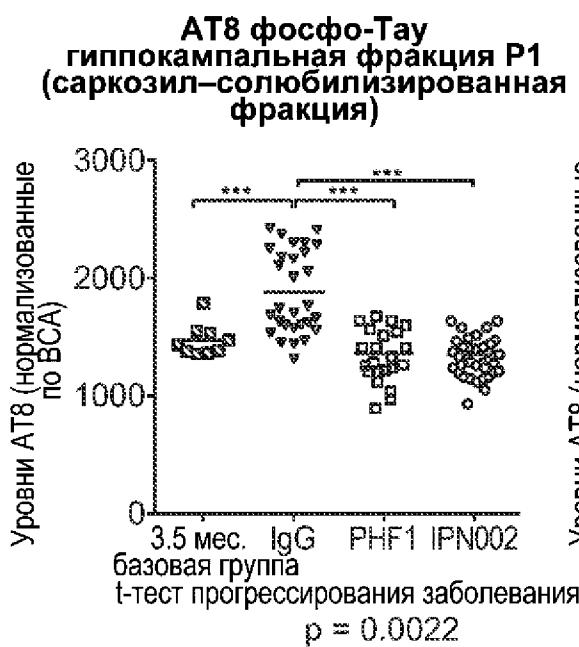
* $p < 0.05$
** $p < 0.01$
*** $p < 0.001$
**** $p < 0.0001$



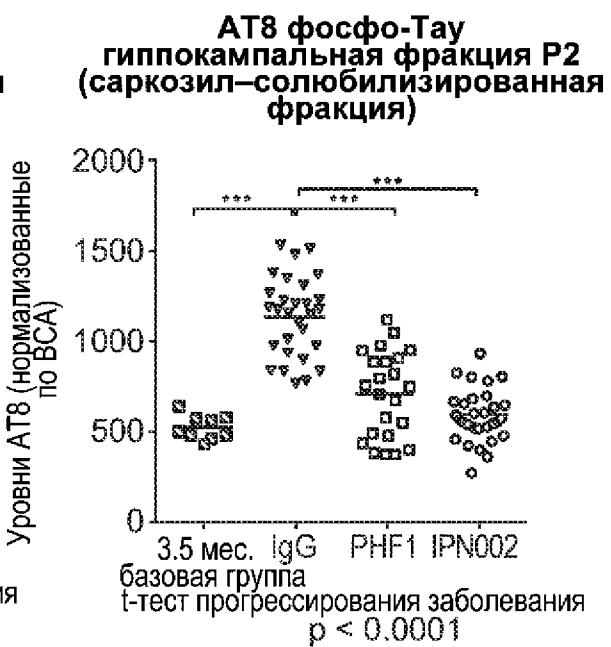
ФИГУРА 44А



ФИГУРА 44В



ФИГУРА 44С



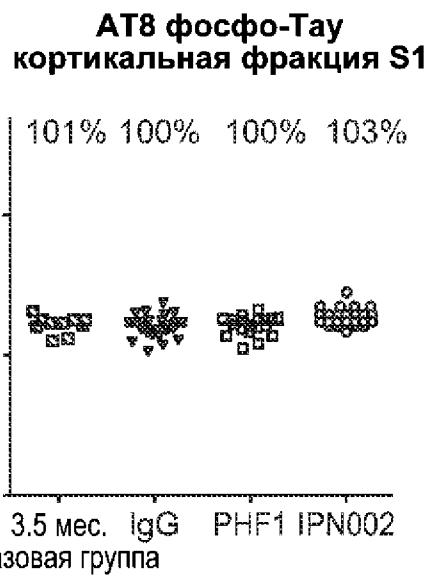
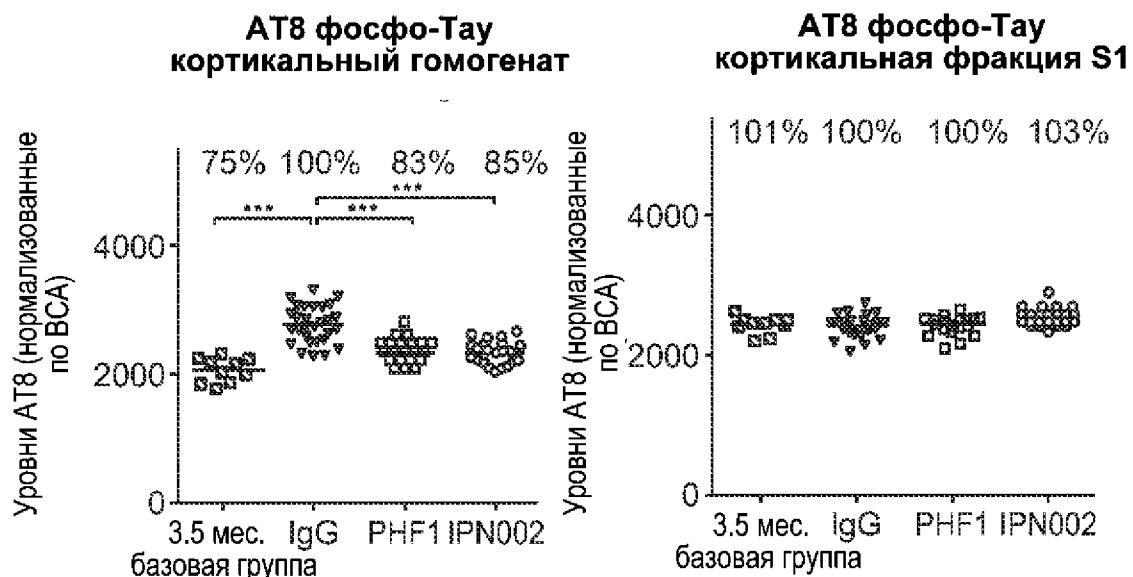
ФИГУРА 44Д

Однофакторный ANOVA с последующим применением критерия Даннетта для множественных сравнений

*= $p<.05$

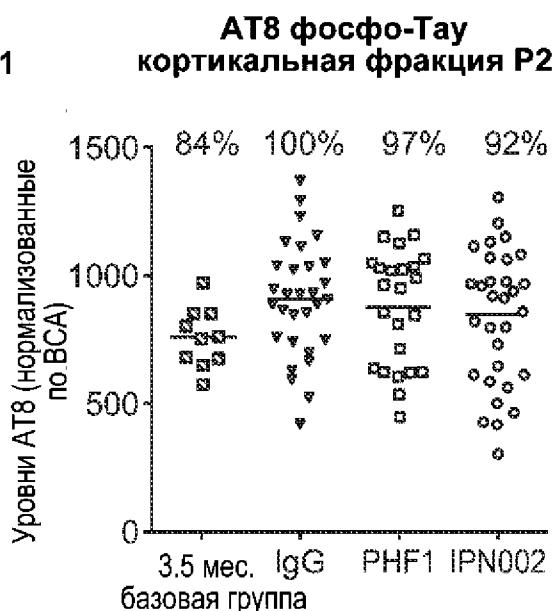
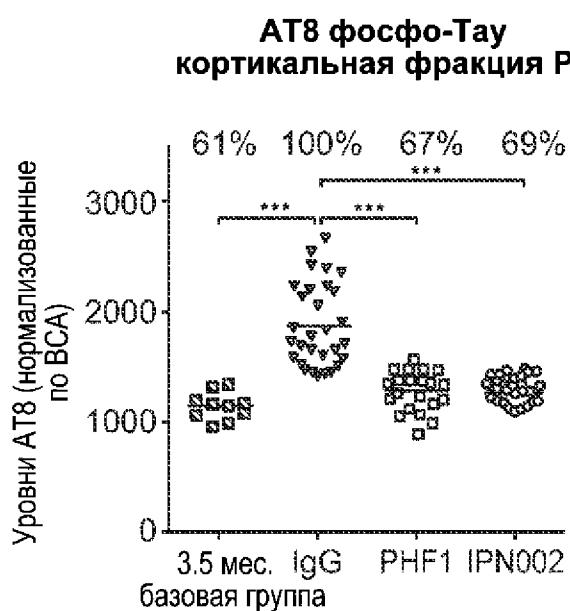
**= $p<.01$

***= $p<.001$



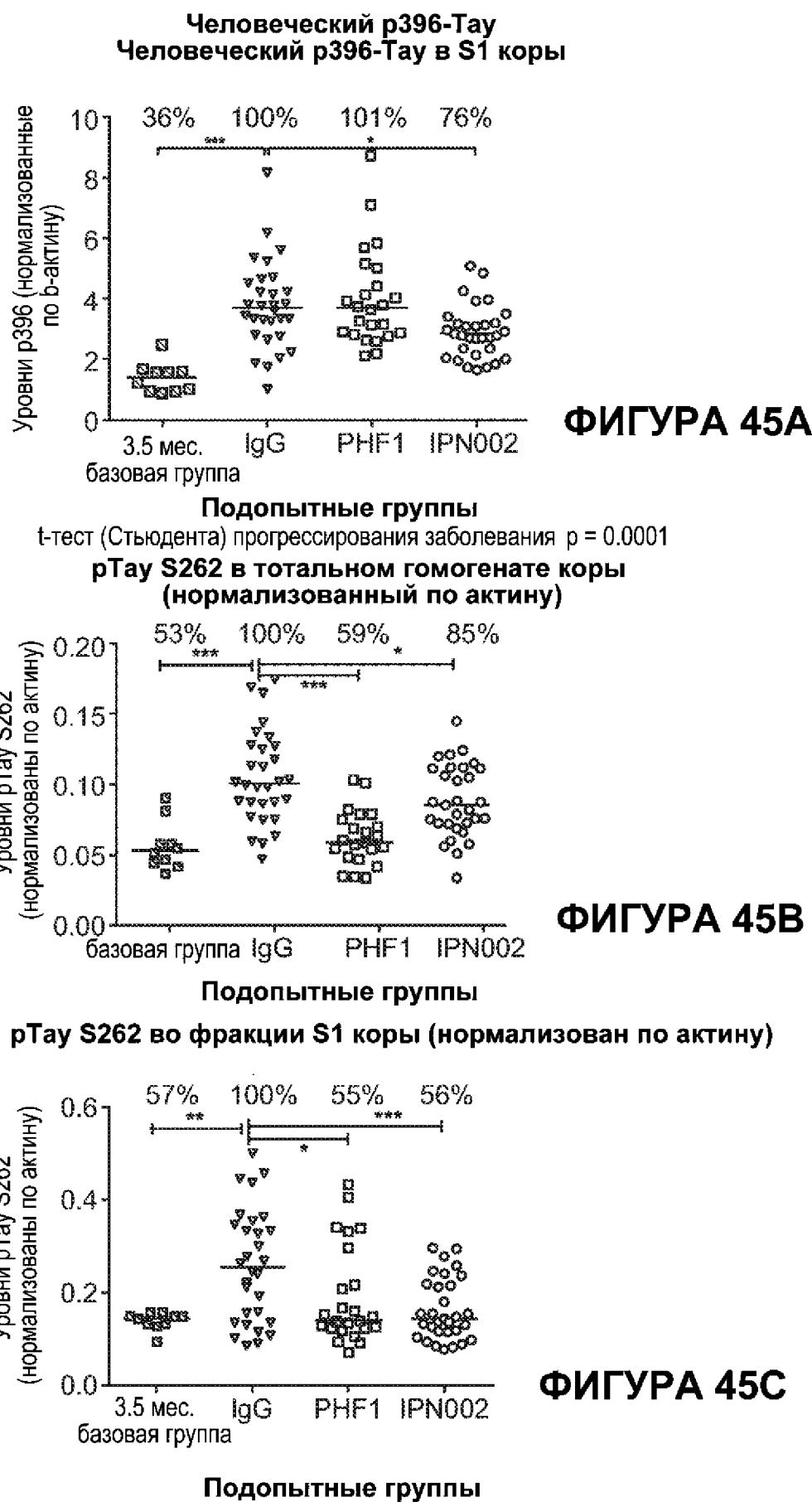
ФИГУРА 44Е

ФИГУРА 44F

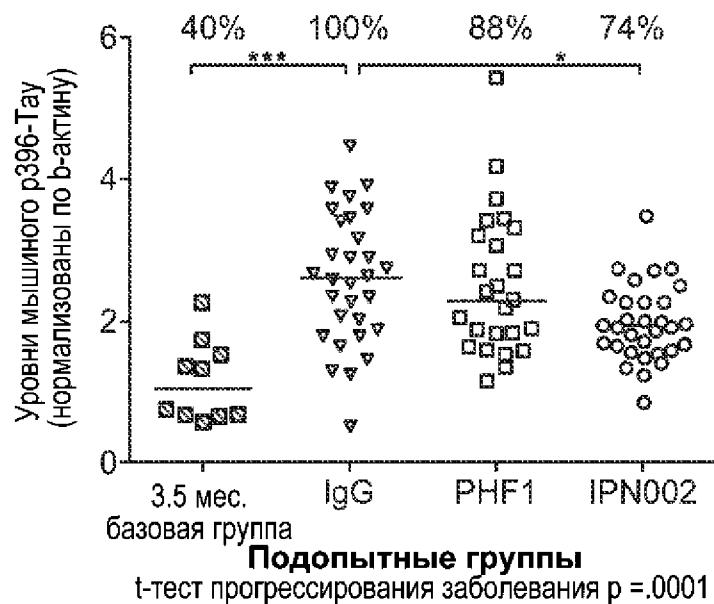


ФИГУРА 44G

ФИГУРА 44Н

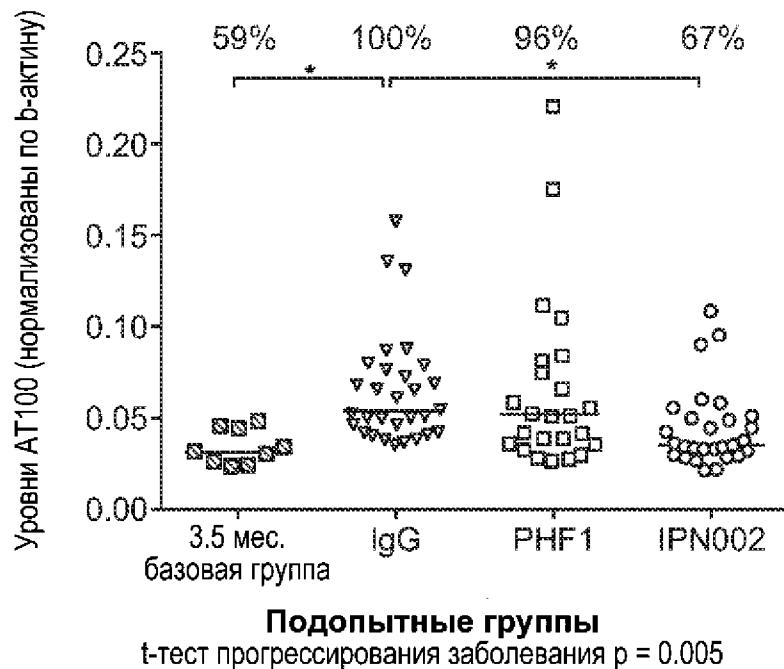


Мышиный p396-Tau
Мышиный p396-Tau в S1 коры



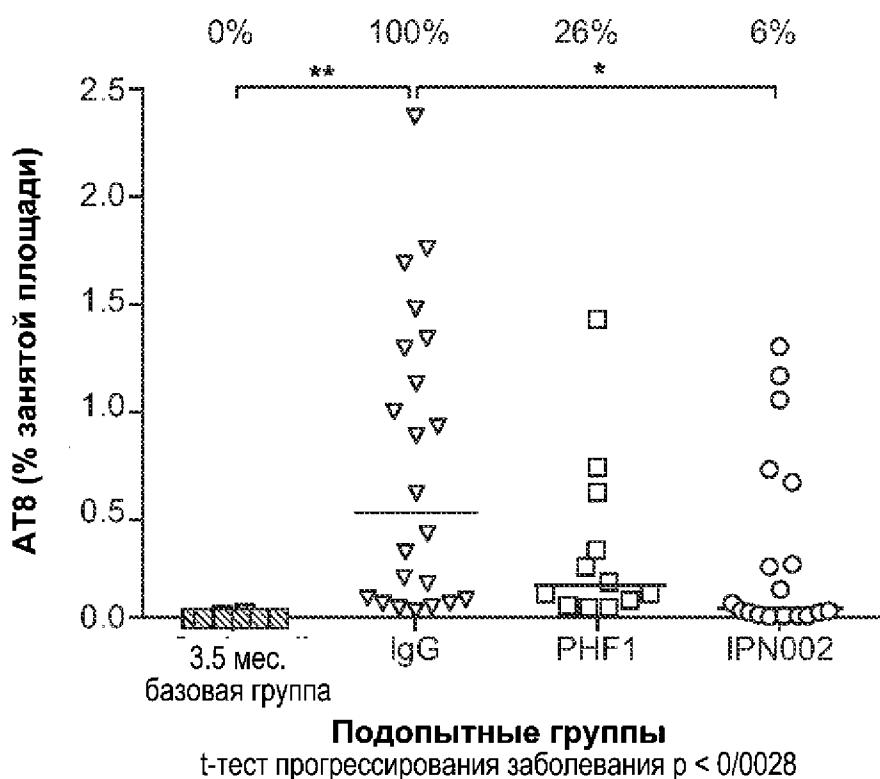
ФИГУРА 45D

Мышиный AT100 в S1 коры



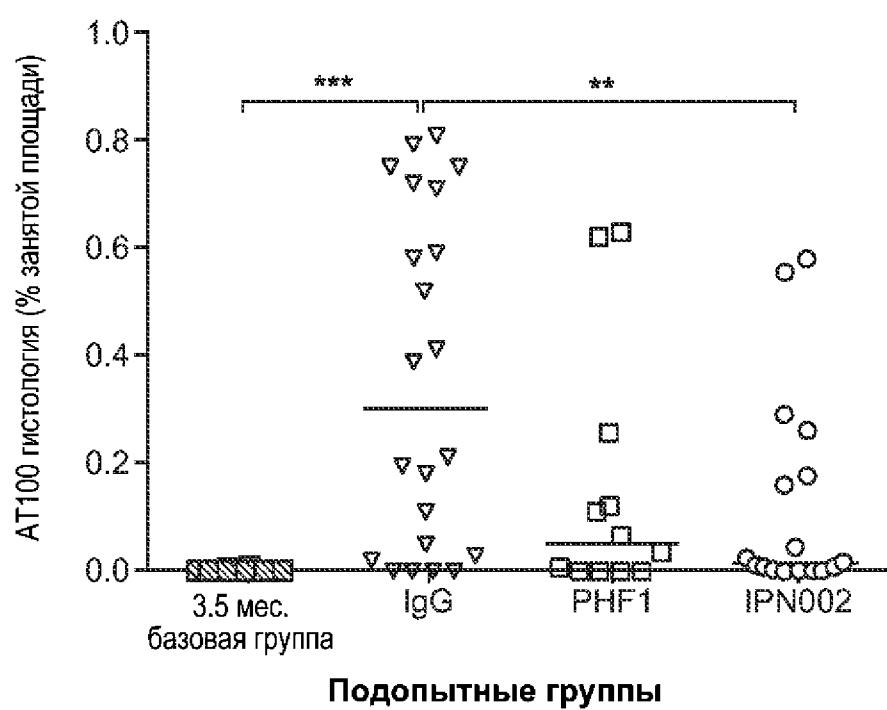
ФИГУРА 45Е

AT8 в заднем мозге, гистология-STH-позднее умерщвление



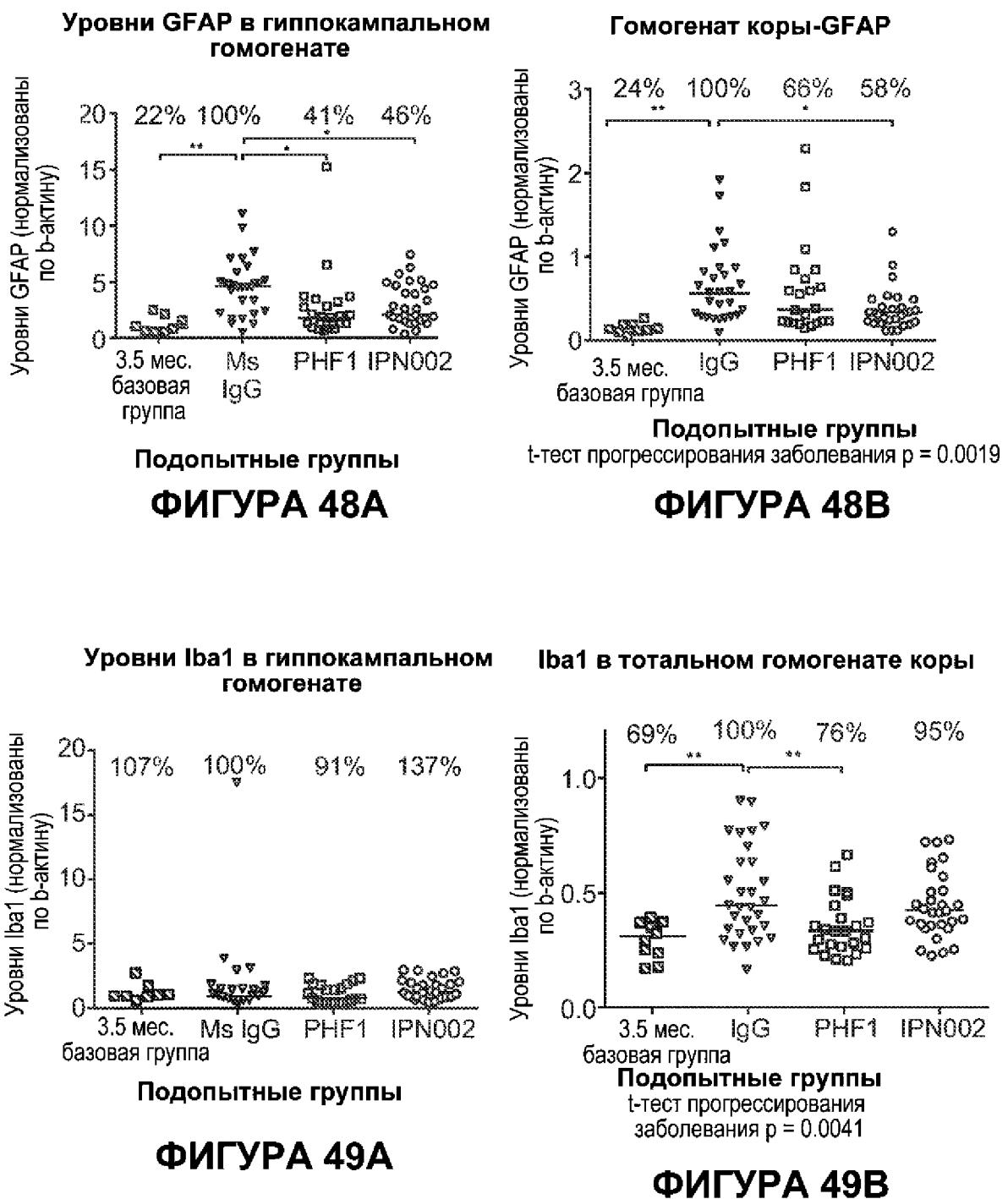
ФИГУРА 46

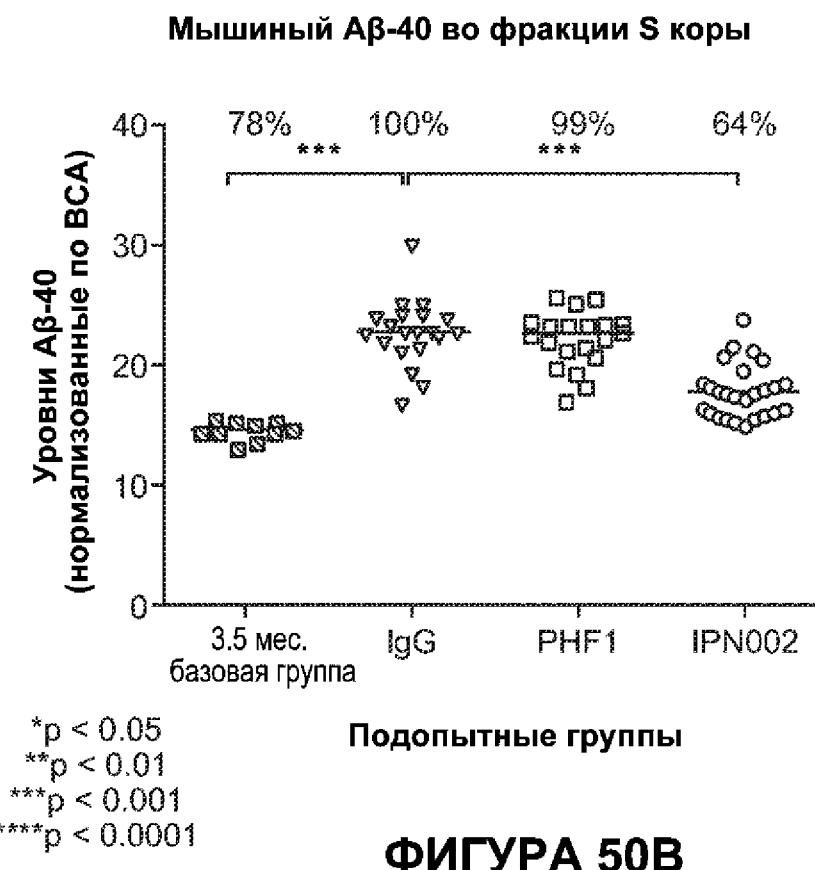
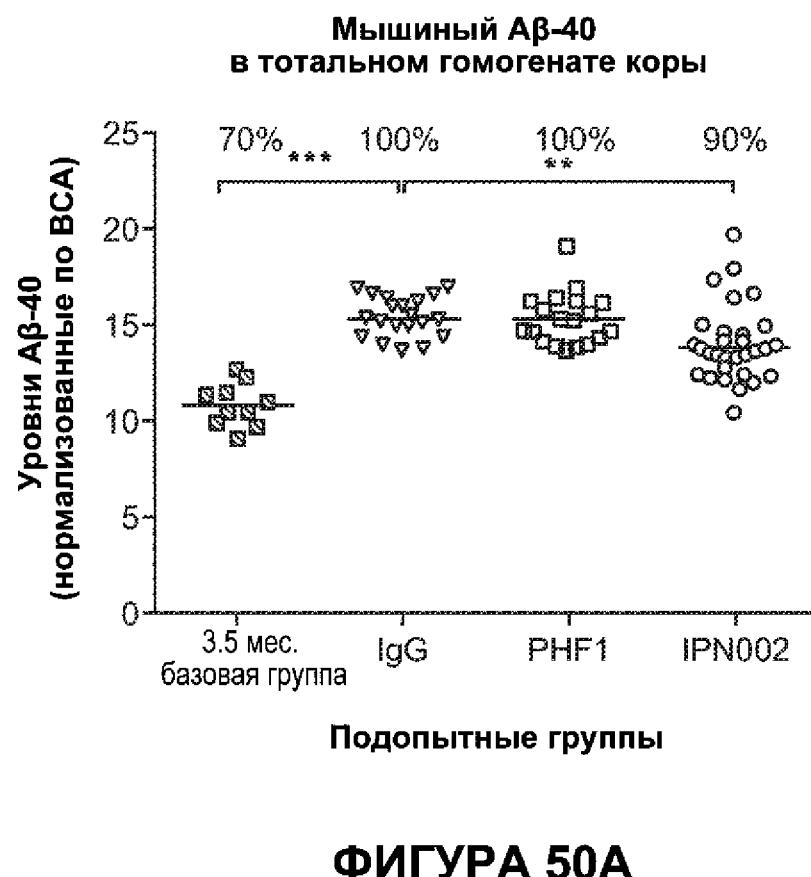
AT100 в заднем мозге, гистология-LATINTAP-позднее умерщвление



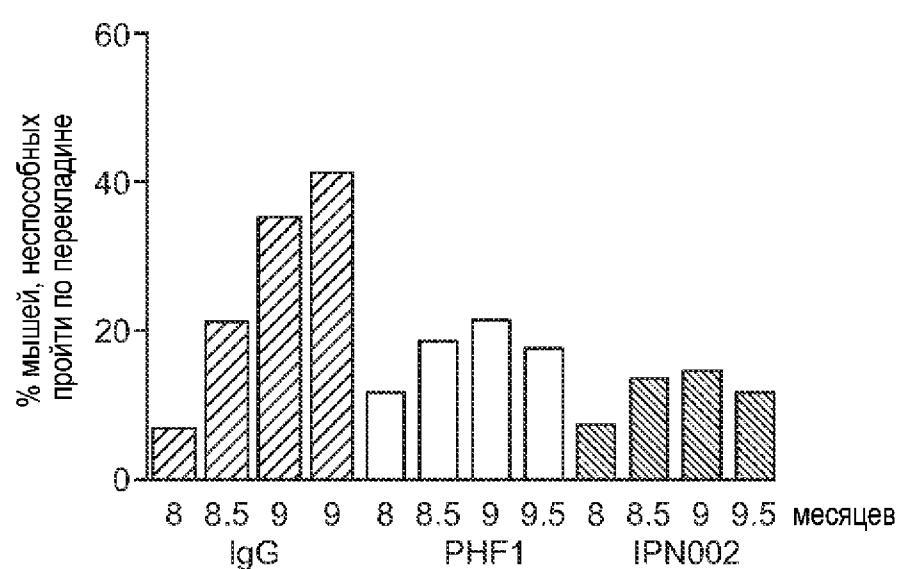
t-тест прогрессирования заболевания $p < 0.0014$

ФИГУРА 47



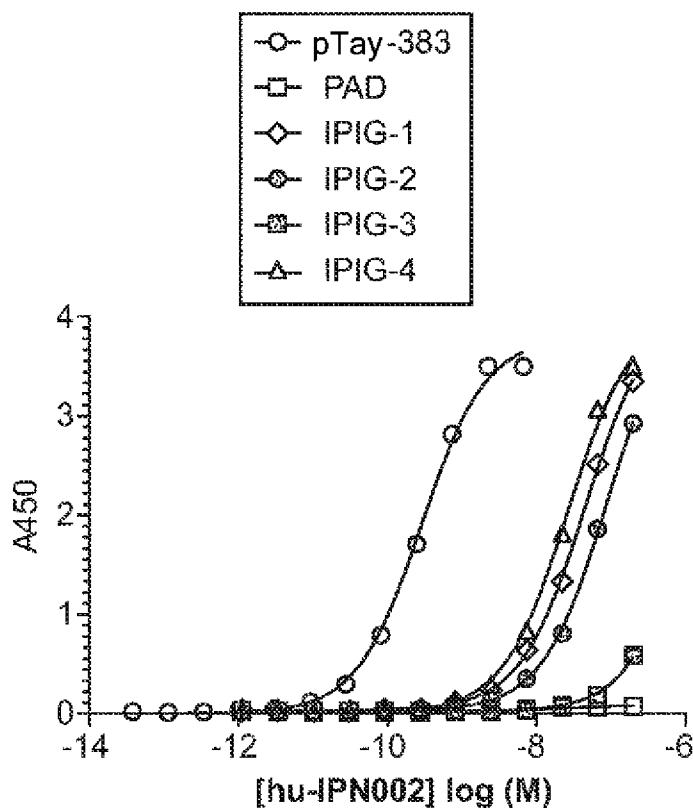


**Процент мышей, неспособных пройти тест
“прогулка по приподнятой перекладине”**



ФИГУРА 51

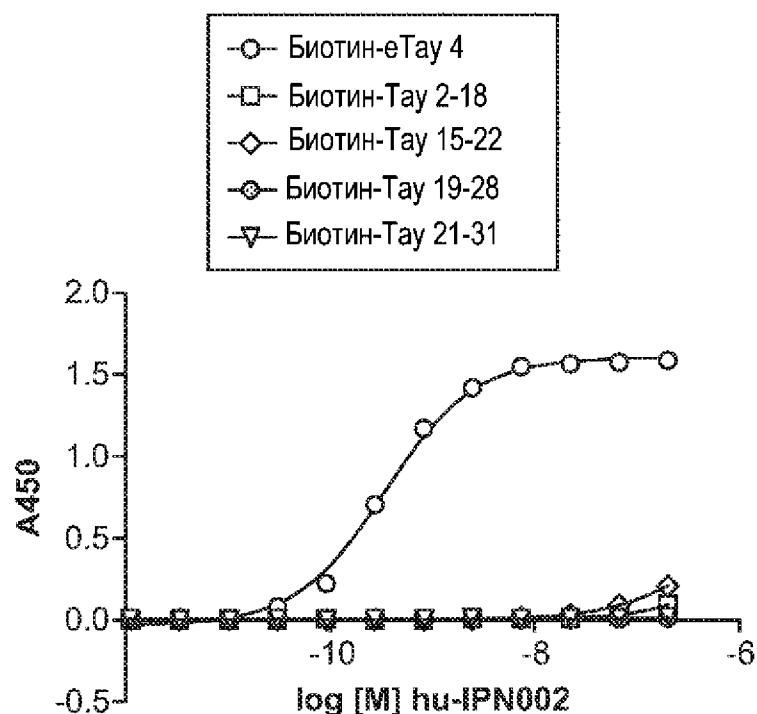
Анализ связывания с hu-IPN002



	hu-IPN002 k_D [M]
pTay-383	2.88E-10
PAD (2-18)	n.a.
IPIG-1 (9-24)	4.52E-08
IPIG-2 (13-24)	9.03E-08
IPIG-3 (15-22)	n.a.
IPIG-4 (15-44)	2.65E-08

ФИГУРА 52

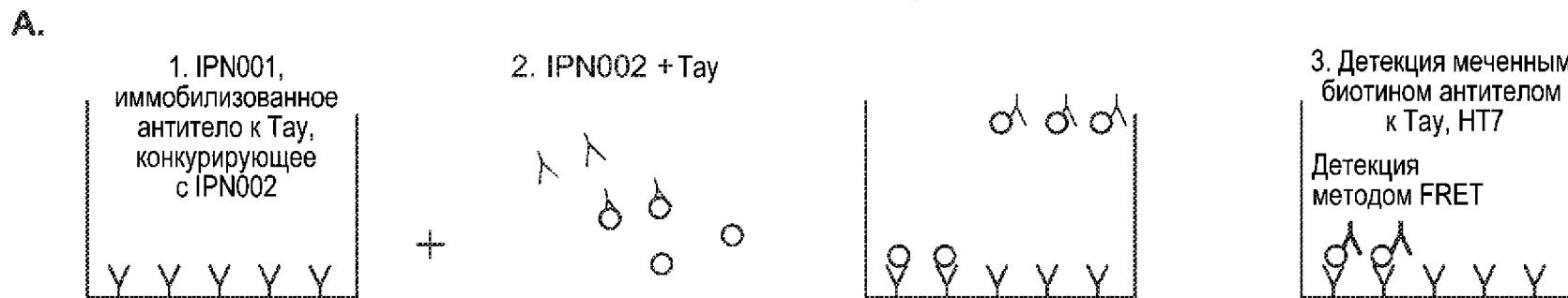
Анализ связывания Tau пептидов с hu-IPN002



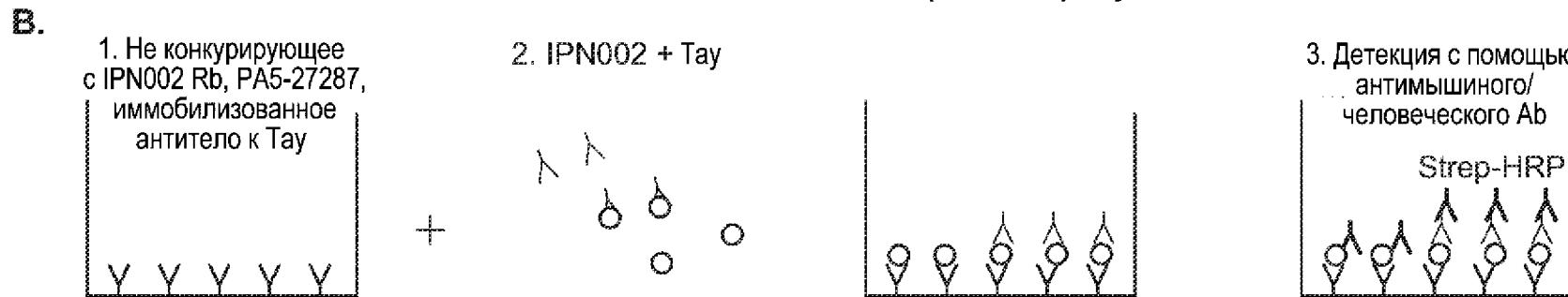
Образец	k_D [M]
Биотин-еTau 4	3.447E-10
Биотин-Tay 2-18	n.a.
Биотин-Tay 15-22	неполный
Биотин-Tay 19-28	n.a.
Биотин-Tay 21-31	n.a.

ФИГУРА 53

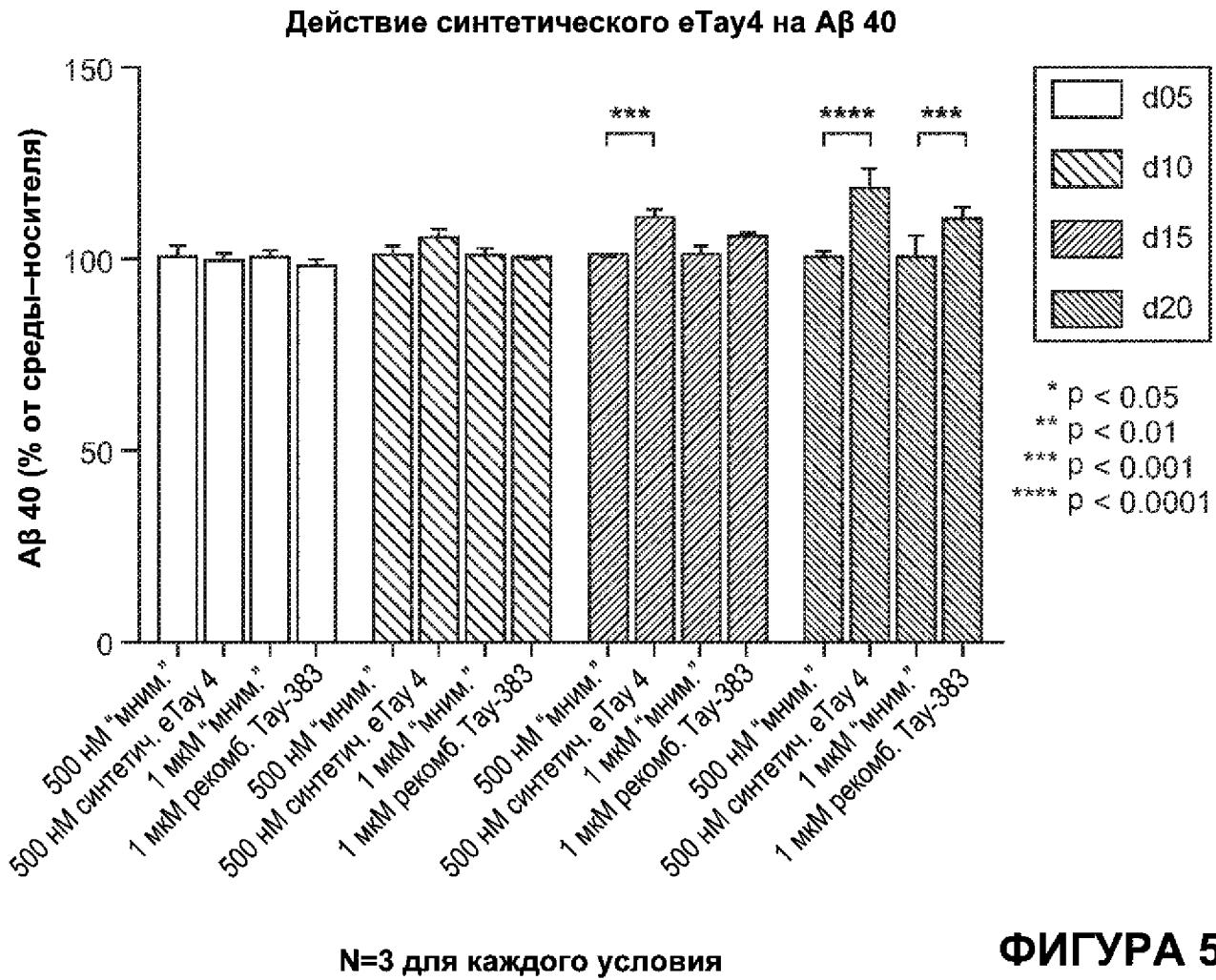
Анализ свободного (от IPN002) Tay

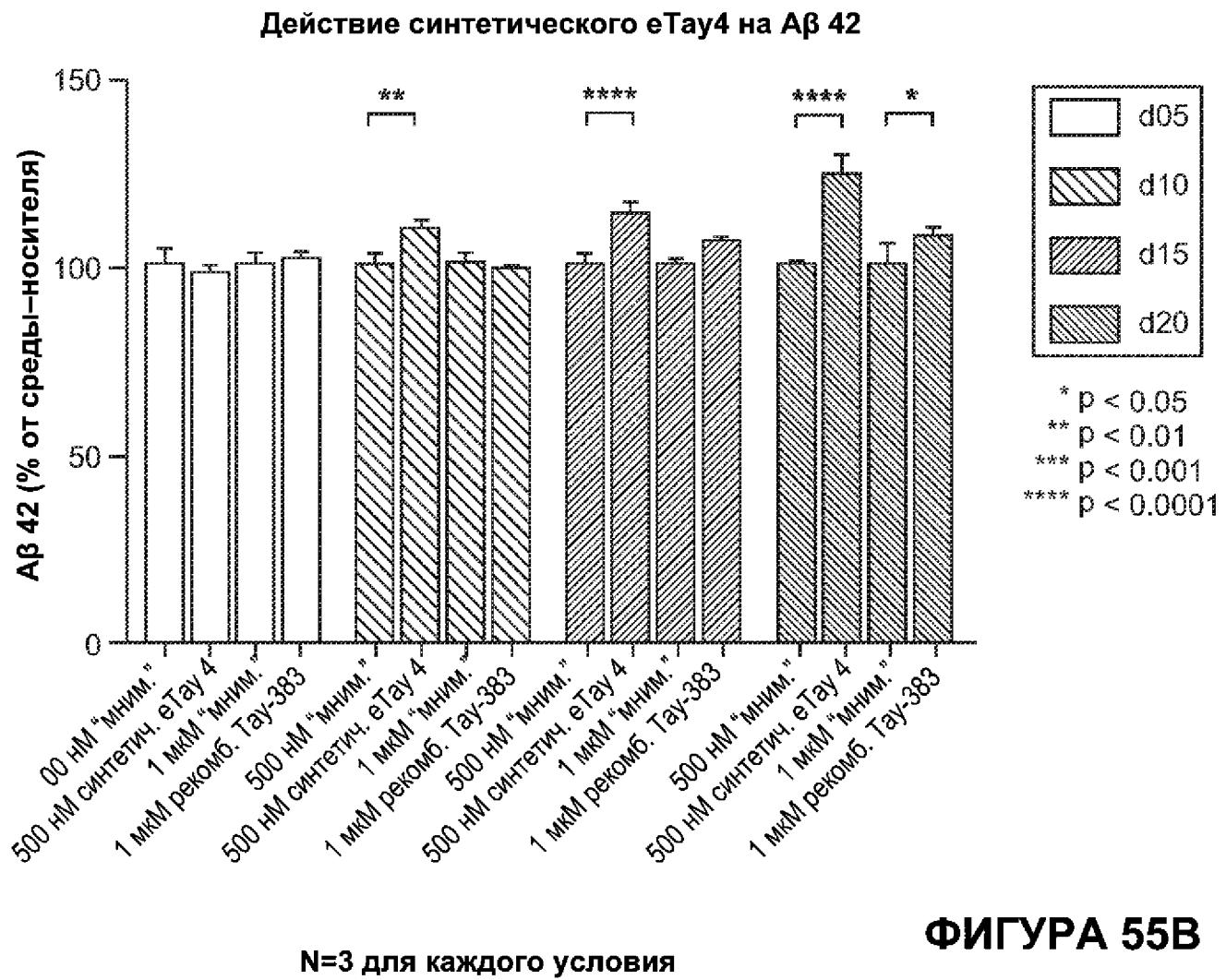


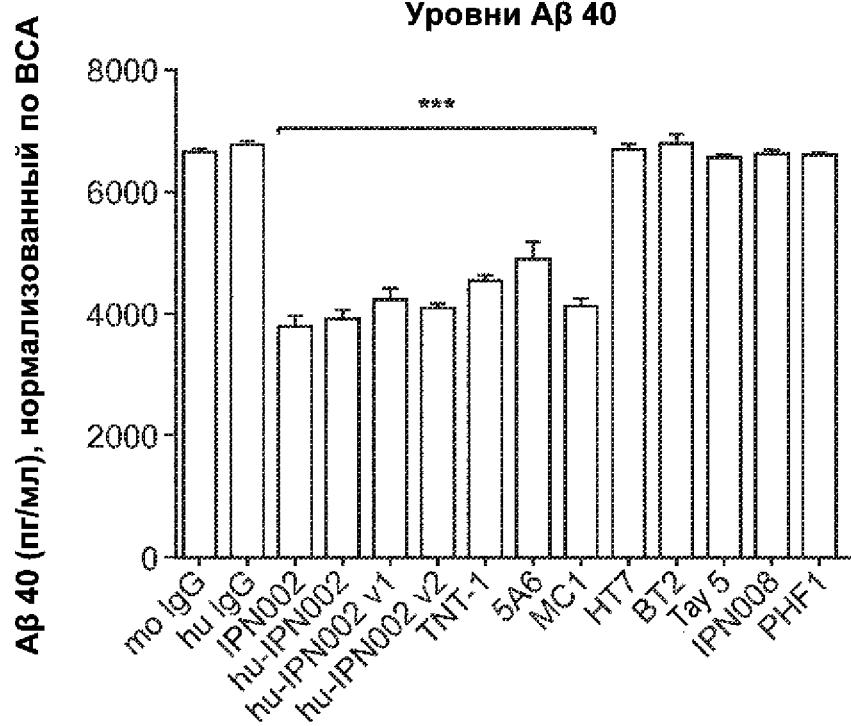
Анализ связанного (с IPN002) Tay



ФИГУРА 54

**ФИГУРА 55А**

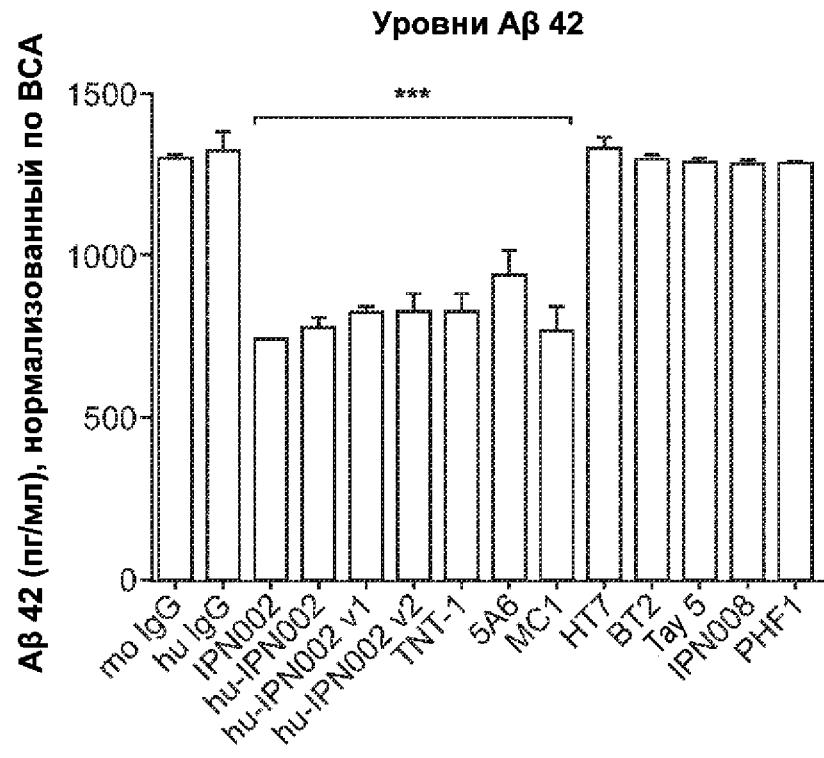




n=3 для каждого состояния
Данные на 20й день обработки, 30 мкг/мл [антитело]

*** p<0.0001
Tay Ab vs. IgG

ФИГУРА 56А



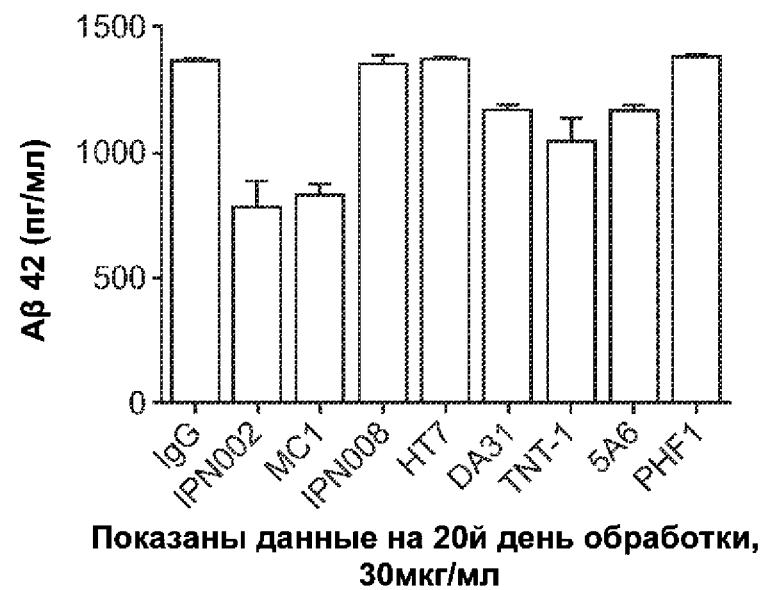
n=3 для каждого состояния
Данные на 20й день обработки, 30 мкг/мл [антитело]

*** p<0.0001
Tay Ab vs. IgG

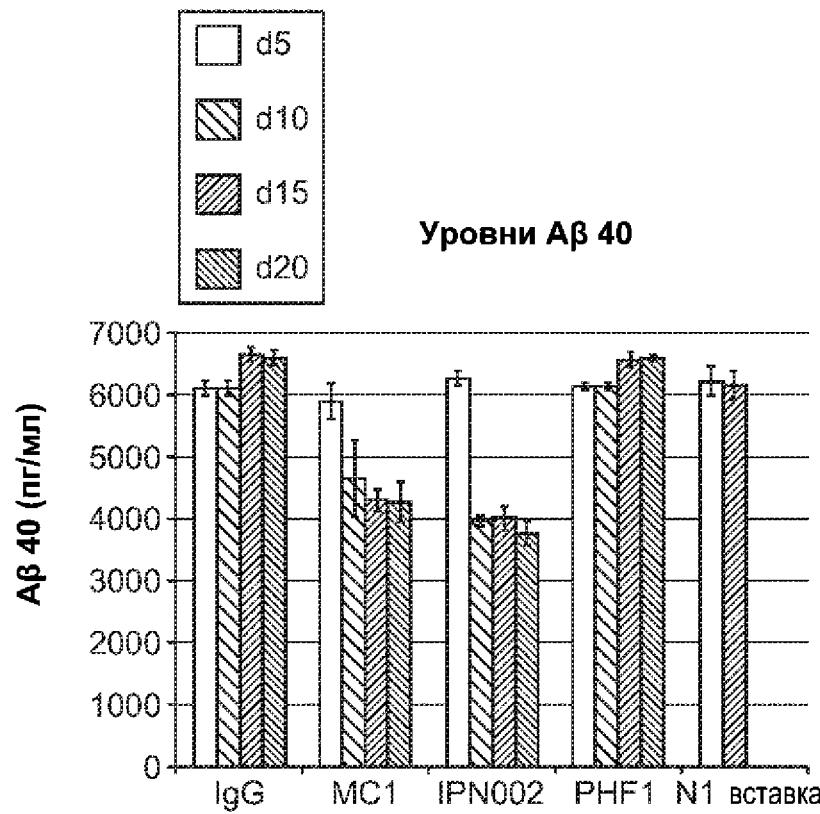
ФИГУРА 56В



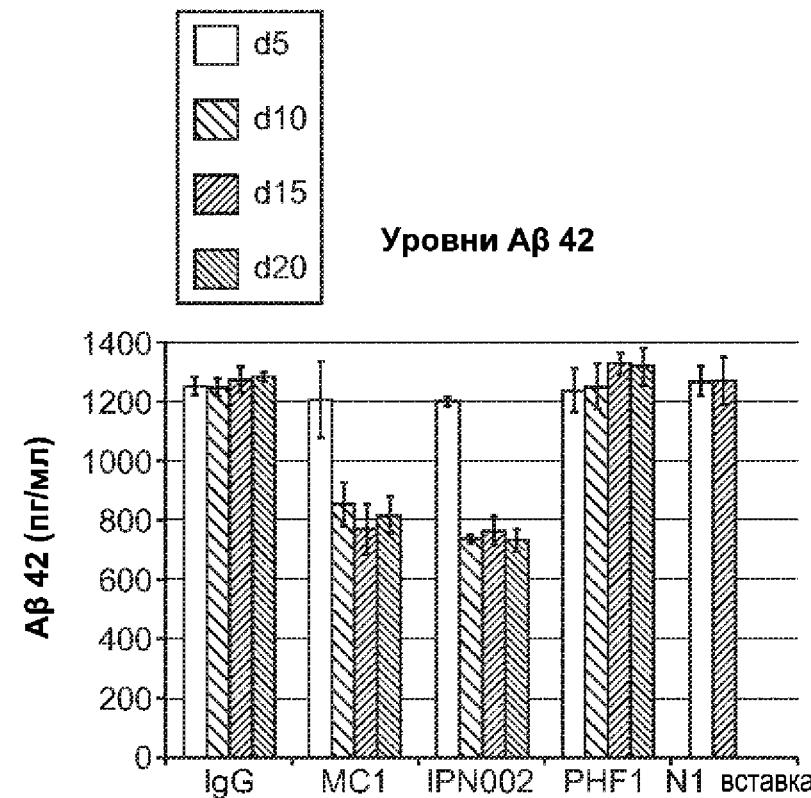
ФИГУРА 57А



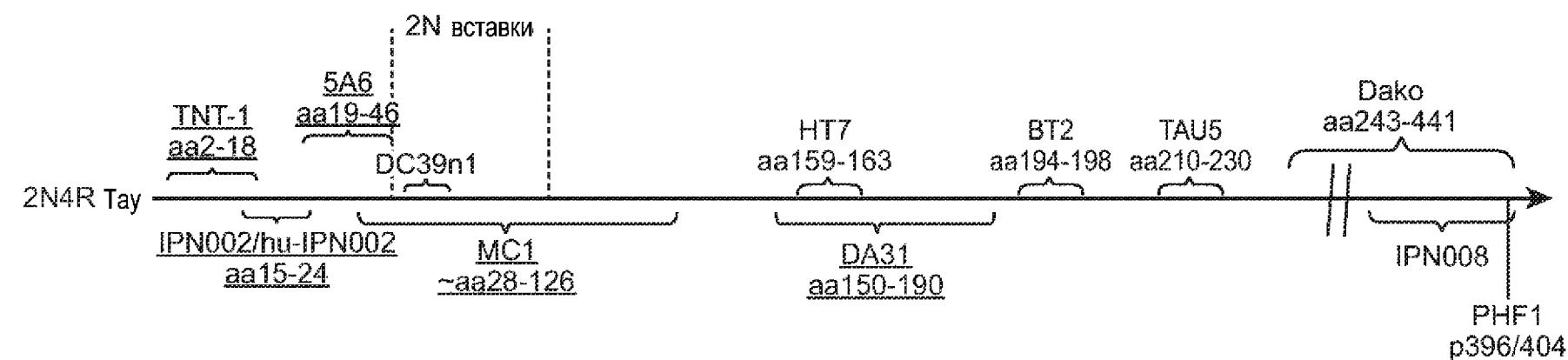
ФИГУРА 57В



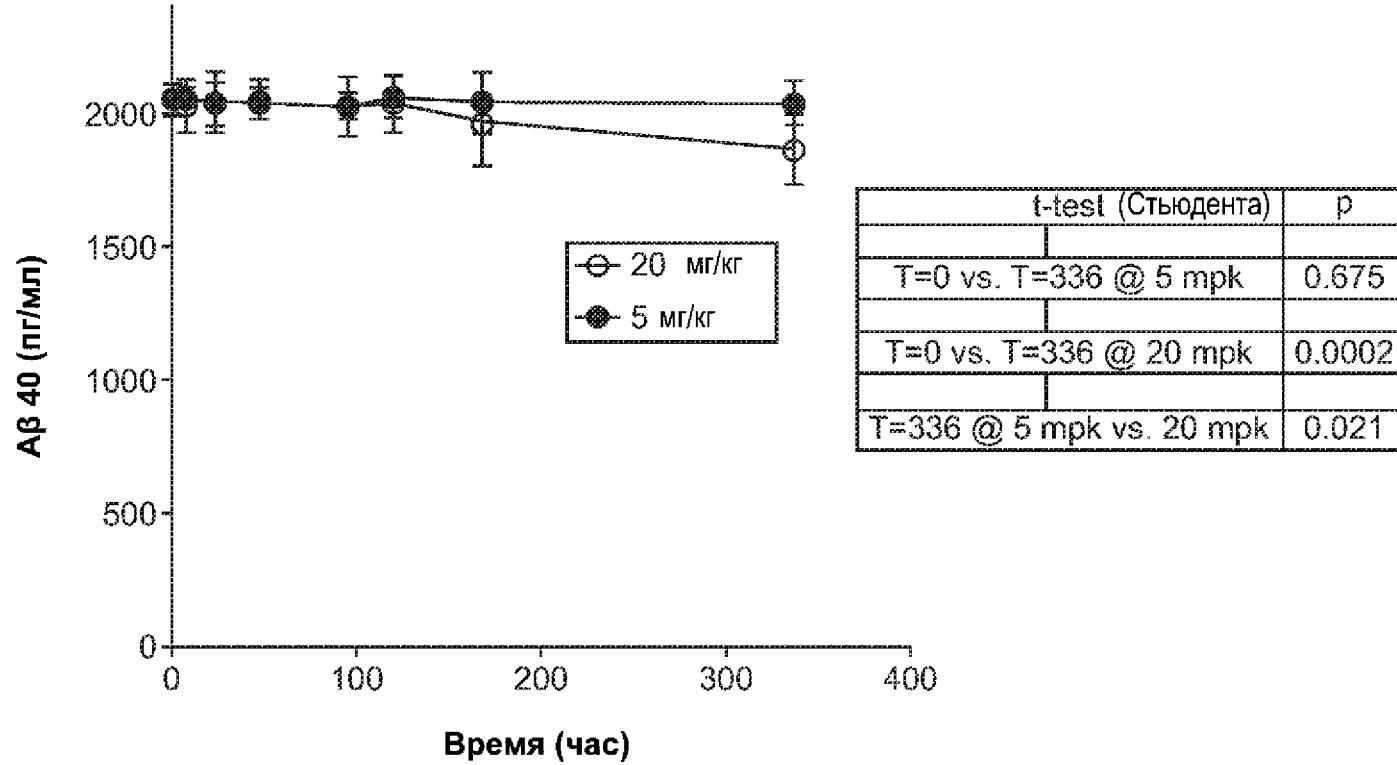
ФИГУРА 58А



ФИГУРА 58В



ФИГУРА 59



ФИГУРА 60

eTay₄	AEPRQEFEVME <u>DHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDT</u> DAGLK-----	43
2N4R	MAEPRQEFEVME <u>DHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDT</u> DAGLKE <u>SPLQTPTEDGSEEPG</u>	60
eTay₄	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	61
2N4R	SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAAEAGIGDTPSLEDEAAG	120
eTay₄	HVTQAR	67
2N4R	HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGA <u>APPGQKGQANATRI</u> PAKTPPAPK	180
2N4R	TPPSSGEPPKSGDR <u>SGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTR</u> EPKVAVVRTFPKSPSSAK	240
2N4R	SRLQTAPVPMPDIKNVKS <u>KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV</u>	300
2N4R	PGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIH <u>HKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNI</u>	360
2N4R	THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHL <u>SNVSSTGSIDMV</u>	420
2N4R	DSPQLATLADEVSASLAKQGL	441

ФИГУРА 61